

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Síntese e *design* racional de novos análogos de nucleósidos e
de nucleótidos como potenciais inibidores de cinases com
interesse terapêutico**

Andreia Jesus Lopes Fortuna

Mestrado em Química
Especialização em Química

Dissertação orientada por:
Doutor Nuno Manuel Xavier e Doutor Paulo Costa

“Ever tried. Ever failed. No matter. Try again. Fail again. Fail better” – Samuel Beckett

Agradecimentos

Queria começar por agradecer ao meu orientador, Doutor Nuno Manuel Xavier, pelo conhecimento transmitido e dedicação, por todo o apoio, por toda a ajuda, por ser um grande exemplo para mim e por acreditar em mim. Obrigado por tudo!

Queria agradecer também ao meu coorientador, Doutor Paulo Costa, sobretudo por toda a paciência e dedicação e por me fazer gostar ainda mais de Química Computacional! Obrigado por tudo! E também ao Rafael Nunes, pela amizade, pelos conselhos e também pela paciência.

Queria também agradecer à Doutora Conceição Oliveira, do Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa pela análise de espetrometria de massa dos compostos novos sintetizados no âmbito deste trabalho.

Este trabalho foi realizado no contexto de 3 projetos financiados pela FCT, nomeadamente os projetos exploratórios IF/01488/2013/CP1159/CT0006 e IF/00069/2014/CP1216/CT0006, no âmbito do programa investigador FCT (referências IF/01488/2013 e IF/00069/2014), e o projeto IC&DT financiado no âmbito do Programa Operacional Regional de Lisboa (Lisboa 2020), Portugal 2020, FEDER/FN, e União Europeia (LISBOA-01-0145-FEDER-028455, PTDC/QUI-QFI/28455/2017).

Não podia deixar de agradecer às pessoas mais importantes da minha vida, aos meus queridos pais. Obrigado por sempre acreditarem em mim e por me ajudarem a concretizar os meus sonhos. Sobretudo, obrigado por me darem o melhor de vocês! Estarei eternamente grata por tudo. Aconteça o que acontecer, irei sempre amar-vos do fundo do meu coração. Dedico-vos todas as minhas vitórias, inclusive esta.

João, se há alguém a quem eu tenho de agradecer é a ti. Sobretudo por me aturares há tanto tempo, por me ouvires, por me ajudares, por me protegeres, por cuidares de mim... obrigado por acreditares sempre em mim, por me dares forças, por me fazeres a pessoa mais feliz do mundo e, sobretudo, pelo facto de me ter tornado uma pessoa melhor graças a ti. Espero que tenhamos o resto da vida para crescermos ainda mais juntos e para continuarmos a ser a inspiração um do outro. Também te dedico esta vitória.

Meus queridos padrinhos, queria agradecer-vos também todo o vosso apoio, toda a amizade, todos os conselhos, todos os momentos que passamos. Vocês sabem o quanto eu vos adoro e que sempre foram e serão das pessoas mais importantes da minha vida. Obrigado também à minha querida Leonor, que é a princesa mais linda que conheço e ao meu afilhado querido, serei sempre uma madrinha completamente babada! És o nosso anjinho.

Um especial agradecimento à minha *partner in crime*, à minha musa, à rapariga mais linda e maravilhosa que conheço, obrigado por tudo Catarina! Pelas inúmeras vezes em que me ajudaste, em que foste ao “meu” laboratório visitar-me, em que me ouviste e me fizeste rir... Para não falar de todos os momentos que passamos, de todas as conversas brilhantes e também completamente *random*, tudo isso que é tão precioso para mim. És mais do que uma melhor amiga, és família. Tal como tu Tiago, obrigado por todos os risos e conselhos, por serem o meu apoio nos bons e maus momentos, vocês são sem dúvida os melhores. Tenho tanta sorte por vos ter na minha vida, obrigado por tudo.

Meu Gabriel, obrigado por ires sempre dar-me um beijinho ao quinto piso do C8, mesmo quando não tinhas tempo, obrigado por todos os conselhos, por todos os risos, por tudo. És das pessoas mais importantes na minha vida e tu sabes disso. Há 4 anos que mudaste a minha vida para melhor! Obrigado também à Mónica, por todos os momentos especiais e espero mesmo que continuemos a ir ao tal restaurante até sermos velhinhos!!

Vítor!!! Para além de amigos, somos colegas de laboratório e isso, é sem dúvida, uma grande aventura (diária). Mesmo assim conseguimos sobreviver, apesar de todos os solventes, de todos os vapores tóxicos, de todos os ácidos e reagentes corrosivos, de todos os problemas (e de todos os dramas), estivemos sempre lá um para o outro. No meio de risos, lágrimas, suor, no meio de cansaços e problemas, a nossa amizade cresceu e venceu! Obrigado por tudo maninho!

Aninha! Minha querida, em pouco tempo conseguiste marcar-nos a todos com o teu sorriso e a tua boa energia! Obrigado por tudo, és das pessoas mais queridas e fantásticas que conheço, obrigado por me inspirares a ser mais arrumada e organizada e por tornares o ambiente no laboratório tão melhor! Sempre que entras, entra alegria contigo! És mesmo muito importante para mim princesa! E Maitê, serás sempre um exemplo para mim! És das mulheres mais fortes, determinadas, corajosas, guapas e inteligentes que eu conheço! És não só, uma excelente investigadora como uma grande amiga! Obrigado por todos os risos, por toda a ajuda e por nos inspirares a todos! Também queria agradecer às restantes pessoas do grupo de Glúcidos e um especial obrigado à Doutora Alice, por toda a simpatia e amizade.

Queria também fazer um agradecimento muito especial ao Eduardo e Berni, por serem a melhor companhia de sempre no laboratório, por todas as ideias maravilhosas, pela ajuda e por todas as nossas conversas. Tenho a certeza que vocês serão excelentes investigadores e quero que saibam que foi um prazer trabalhar convosco (e fica o sonho de um dia ser vossa orientadora)!

Por fim, queria agradecer à minha avozinha querida, aos meus avós do coração, aos primos e tios - àqueles que sempre acreditaram em mim e estiveram sempre lá, nos bons e maus momentos. Um obrigado especial também à madrinha Dominique, à D. Idália e D. Dica, à D. Maria e Sr. Max e ao Sr. Orlando e D. Fernanda. A todos vós, muito obrigado!

Resumo

Os nucleósidos e nucleótidos são moléculas cruciais para a vida, desempenhando funções chave em inúmeros processos biológicos fundamentais como a síntese do DNA e RNA, divisão celular e metabolismo. O desenvolvimento de análogos sintéticos destes compostos tem sido explorado ao longo dos anos, tendo conduzido a vários fármacos que são utilizados no tratamento do cancro e de doenças virais. Para além disso, existem evidências do potencial de compostos deste tipo para inibir colinesterases e para exibir atividade antimicrobiana. Apesar do seu enorme potencial terapêutico, no que se refere às suas propriedades anticancerígenas e antivirais, existem alguns problemas associados ao seu usual mecanismo de ação. Existem vários mecanismos de resistência que as células exibem face à ação destes compostos, como por exemplo, a diminuição de proteínas transportadoras de nucleósidos, o que impossibilita a passagem destas moléculas para dentro das células, devido à sua polaridade. Deste modo, o desenvolvimento de novos análogos contendo substituintes estáveis e apolares e exibindo novos mecanismos de ação ou atuando em alvos biológicos pouco explorados, poderá ultrapassar estes problemas.

Neste trabalho foram sintetizados novos análogos de nucleósidos, contendo o grupo guanidina, devido ao facto de ser um potencial mimético de uma base azotada, partindo de derivados de xilofuranose contendo diferentes *O*-substituintes na posição 3. Foram abordados dois diferentes métodos de redução/guanidinilação e os compostos desejados foram obtidos com sucesso. A partir desses derivados também foi possível sintetizar estruturas inovadoras de isonucleótidos, contendo um grupo fosfato ou um grupo fosforamido na posição 5 e uma unidade benziltriazole numa *O*-ramificação da posição 3 como um sistema mimético de uma nucleobase. Foram abordadas as reações de fosforilação e Staudinger-fosfito para a síntese destes compostos, respetivamente. Por fim, foram também obtidos novos análogos de nucleótidos contendo o grupo uracilo na posição anomérica e um grupo (metil)triazolil fosfonato como um possível mimético estável e neutro do grupo difosfato. Para a síntese destes compostos as reações de ciclização térmica e *N*-glicosilação foram exploradas.

A afinidade destes compostos para as enzimas CDK2 e GSK3 β foi estudada por *docking* molecular, uma vez que estas enzimas são potenciais alvos terapêuticos para o cancro e para a doença de Alzheimer/diabetes, respetivamente. De um modo geral, as moléculas ou características estruturais que permitiram obter melhores resultados em termos de afinidade de ligação às enzimas foram: guanidino furanoses contendo o grupo benziltriazole, derivados de metil triazoles contendo o substituinte *O*-benzilo na posição 3 e grupo fosfato *O*-substituído por grupos fenilos. Deste modo, os resultados foram bastante positivos e motivadores para a realização de futuros testes biológicos.

Palavras-Chave: isonucleótidos, isonucleósidos, análogos de nucleósidos/nucleótidos, guanidino açúcares, cinases.

Abstract

Nucleosides and nucleotides are crucial molecules for life that play a key role in fundamental biological processes such as a synthesis of DNA and RNA, cell division and metabolism. The development of synthetic analogues of these molecules has been explored throughout the years and has led to a number of drugs that are used nowadays for the treatment of cancer and viral diseases. Furthermore, some reports showed the potential of these types of compounds to display cholinesterase inhibitory properties and antimicrobial activity. On the other hand, despite their significant therapeutic profile, considering their anticancer and antiviral properties, there are some problems related to their mechanisms of action. Various mechanisms of resistance are exhibited by cells against the action of these compounds, such as the decrease on the level of nucleoside transporters, which perturbs their passage to the intracellular medium due to their polarity. Thus, the development of new analogues containing stable and less polar moieties and exhibiting new mechanism of action or focussing rather less exploited biological targets, are required to overcome these problems.

In this work, new nucleoside analogues comprising a guanidine group as a potential mimetic of a nucleobase, were synthesized. These compounds were obtained successfully from bis-functionalized xylofuranose derivatives containing different *O*-substituents in position 3, using two different reduction/guanidinylation methods. Innovative isonucleotides were obtained from these precursors, comprising a phosphate or a phosphoramidate group and a triazole moiety in the position 3, as a mimetic of a nucleobase. For the access of these compounds, the synthetic strategies involved phosphorylation and Staudinger-phosphite reactions, respectively. Moreover, new nucleotide analogues containing a uracil moiety in the anomeric position and comprising a (triazolyl)methyl phosphonate system as a stable and neutral mimetic of a diphosphate group, were synthesized. These compounds were obtained by N-glycosylation and thermal cyclization reactions.

The affinity of these compounds for CDK2 and GSK3 β was studied by molecular *docking*, since these enzymes are potential therapeutic targets for cancer and Alzheimer's disease/diabetes, respectively. The molecules/structural features that enabled obtaining better results in terms of binding affinities to the enzymes are the following: guanidino sugars comprising a benzyl triazole system, methyl triazole derivatives having an *O*-benzyl group in the position 3 and phosphate moieties containing *O*-phenyl groups. These results are very promising and encourage further biological testing of these molecules.

Keywords: isonucleotides; isonucleosides; nucleoside/nucleotide analogues, guanidino sugars; kinases

Este trabalho foi apresentado nas seguintes comunicações:

Poster: “Synthesis of bis-functionalized furanose derivatives towards new types of nucleoside and nucleotide analogs”, Andreia Fortuna*, Paulo Costa, Nuno M. Xavier, *6th Portuguese Young Chemists Meeting*, Setúbal, Maio 2018.

Comunicação Flash: “Synthesis of new types of potentially bioactive furanosyl nucleoside and nucleotide analogues”, Andreia Fortuna*, Nathalya Mesquita, Glaucius Oliva, Nuno M. Xavier, *Iberian Day, 29th International Carbohydrate Symposium*, Universidade de Lisboa, Julho 2018.

Índice Geral

Capítulo 1

| | |
|--|-----------|
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1. Cinases 1 | |
| 1.1.1. CDKs e o seu papel na divisão celular | 2 |
| 1.1.2. CDK2 – Cinase dependente de ciclina 2 | 3 |
| 1.1.3. GSK-3 β – Glicogénio sintase cinase 3 β | 5 |
| 1.2. Nucleósidos e Nucleótidos | 7 |
| 1.2.1. Análogos de Nucleósidos e Nucleótidos | 9 |
| 1.2.1. Mecanismo de ação dos análogos de nucleósidos e nucleótidos | 11 |
| 1.2.3. Análogos contendo o grupo fosfonato | 13 |
| 1.2.4. Análogos contendo o grupo fosforamidato | 14 |
| 1.3. Compostos alvo | 15 |
| 1.3.1. Plano de Síntese | 17 |
| 1.3.2. Guanidinilação | 18 |
| 1.3.3. Reação de Staudinger | 19 |
| 1.3.4. Click-chemistry | 19 |
| 1.3.5. Reação de Arbuzov | 20 |
| 1.3.6. Reação de Staudinger-fosfito | 20 |
| 1.3.7. N-Glicosilação de nucleobases sililadas | 21 |
| 1.4. Docking Molecular | 21 |

Capítulo 2

| | |
|---|-----------|
| 2. Apresentação e Discussão de resultados | 23 |
| 2.1. Síntese de 5-azido-xilofuranoses | 23 |
| 2.2. Síntese de guanidino açúcares | 25 |
| 2.3. Formação intramolecular do ciclo triazole | 26 |
| 2.4. Síntese dos isonucleótidos | 28 |

| | | |
|--------|--|-----------|
| 2.5. | Reações de hidroboração-oxidação..... | 31 |
| 2.6. | Síntese de análogos de nucleótidos..... | 32 |
| 2.6.1. | Síntese de análogos contendo o sistema (triazolil)metil fosfonato..... | 32 |
| 2.6.2. | Síntese dos análogos contendo o sistema (triazolil)metil fosforamidato | 34 |
| 2.7. | N-Glicosilação..... | 36 |
| 2.8. | Docking Molecular | 37 |

Capítulo 3

| | | |
|----|---|-----------|
| 3. | Conclusão e Perspetivas futuras..... | 48 |
|----|---|-----------|

Capítulo 4

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4. | Parte experimental..... | 53 |
| 4.1. | Síntese dos compostos | 53 |
| 4.1.1. | Instrumentação..... | 53 |
| 4.1.2. | Técnicas de separação e purificação..... | 54 |
| 4.1.3. | Procedimento geral para a introdução dos substituintes na posição 3 do açúcar..... | 54 |
| 4.1.4. | Procedimento geral para a desproteção seletiva do grupo isopropilideno ... | 55 |
| 4.1.5. | Procedimento geral para a clivagem oxidativa | 57 |
| 4.1.6. | Procedimento geral para a redução do aldeído | 58 |
| 4.1.7. | Procedimento geral para a tosilação | 60 |
| 4.1.8. | Procedimento geral para a azidação | 61 |
| 4.1.9. | Procedimento geral para a reação de guanidinilação..... | 64 |
| 4.1.9.1. | Método 1 | 64 |
| 4.1.9.2. | Método 2 | 65 |
| 4.1.10. | Formação intramolecular do ciclo triazole (31) - 3,5'-Anidro-5-desoxi-5-(5-hidroximetil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il)-1,2- <i>O</i> -isopropilideno- α -D-xilofuranose | 68 |
| 4.1.11. | Procedimento geral para a introdução do grupo difenil fosfato | 69 |
| 4.1.12. | Procedimento geral para a introdução do grupo dietil fosfato | 70 |
| 4.1.13. | Procedimento geral para a <i>Click-chemistry</i> | 71 |

| | |
|---|-----------|
| 4.1.14. Síntese do composto 40 - 3- <i>O</i> -(1-Benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil-5-desoxi-5-(dietilfosfono)amino-1,2- <i>O</i> -isopropilideno- α -D-xilofuranose ou Dietil <i>N</i> -[3- <i>O</i> -(1-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil-5-desoxi-1,2- <i>O</i> -isopropilideno- α -D-xilofuran-5-il]fosforamidato..... | 74 |
| 4.1.15. Síntese do composto 41 - 5-bromo-5-desoxi-3- <i>O</i> -propargil-1,2- <i>O</i> -isopropilideno- α -D-xilofuranose | 75 |
| 4.1.16. Procedimento geral da hidroboração-oxidação | 76 |
| 4.1.17. Procedimento geral da ciclização térmica | 77 |
| 4.1.18. Procedimento geral para a Arbuzov | 82 |
| 4.1.19. Procedimento geral para a síntese dos compostos contendo o sistema N-(triazolil)metil fosforamidato..... | 84 |
| 4.1.20. Procedimento geral para a desproteção do grupo isopropilideno 1,2 e acetilação..... | 86 |
| 4.1.21. Procedimento geral para a <i>N</i> -glicosilação | 88 |
| 4.2. Metodologia – Docking Molecular..... | 90 |
| 5. Bibliografia..... | 92 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1: Imatinib (Glivec®), o primeiro inibidor de cinases ⁴ | 1 |
| Figura 2: Regulação do ciclo celular por CDKs: o diagrama representativo contendo as diferentes fases do ciclo de divisão celular e o papel das CDKs juntamente com as suas respetivas ciclinas. | 2 |
| Figura 3: Estrutura da cinase dependente de ciclina 2 (CDK2), complexada com ATP (PDB:4EOQ). ^{13,14} | 3 |
| Figura 4: Inibidores de CDKs reportados na literatura: flavopiridol ¹⁷ , seliciclib (roscovitina) ¹⁸ , dinaciclib ¹⁹ e xilocidina ²⁰ | 4 |
| Figura 5: Estrutura da glicogénio sintase cinase 3beta (GSK-3β) complexada com o inibidor 5-imidazol-2-il-4-fenilpirimidina-2-il)[2-(2-piridilamino)etil]amina (PDB: 6B8J). ^{13,14,25} | 5 |
| Figura 6: Inibidores de GSK reportados na literatura: CHIR 99021 ³³ , estaurosporina ³⁴ e 6-bromo-indirubina-3'-oxima (6BIO) ³² | 7 |
| Figura 7: Estrutura geral de nucleósidos | 8 |
| Figura 8: Representação das várias bases azotadas presentes nos nucleósidos naturais | 8 |
| Figura 9: Representação geral do papel dos nucleótidos nas células: No núcleo, encontra-se presente o DNA – na imagem, destaca-se a união por ligações de hidrogénio entre duas cadeias de DNA - complementaridade de bases; O ATP, encontra-se presente dentro (e fora) das células, responsável pelo armazenamento de energia e desempenhando um papel crucial em inúmeros processos biológicos. | 9 |
| Figura 10: Exemplo de análogos de nucleósidos e nucleótidos utilizados atualmente na quimioterapia (anticancerígena e antiviral): citarabina ³⁶ , gemcitabina ³⁷ , fludarabina ³⁸ e sofosbuvir ³⁹ | 10 |
| Figura 11: Mecanismo de ativação dos análogos de nucleósidos. | 12 |
| Figura 12: Representação geral da entrada nas células de nucleósidos e de nucleósidos monofosfato (ou monofosfonatos e monofosforamidatos), sendo que os primeiros necessitam de transportadores de nucleósidos e que os segundos não conseguem passar pela membrana, devido à carga negativa do grupo fosfato. Quando se introduzem grupos mascaradores, os compostos atravessam a membrana celular mais facilmente e, dentro da célula, existe a remoção química ou enzimática desses grupos mascaradores, sendo posteriormente fosforilados para dar origem ao composto ativo..... | 13 |
| Figura 13: Exemplo de compostos utilizados como antivirais atualmente contendo grupos fosfonato: cidofovir ⁴⁹ , adefovir ⁵⁰ e tenofovir disoproxil ⁵¹ | 13 |

| | |
|---|----|
| Figura 14: Representação da ação das fosfodiesterases, fosforamidases e cinases nos análogos de nucleótidos contendo o grupo fosforamidato. | 15 |
| Figura 15: Estruturas gerais dos compostos alvo..... | 16 |
| Figura 16: Guanidino açúcares como potenciais miméticos de nucleósidos..... | 16 |
| Figura 17: Representação esquemática do modo de ligação do ATP a uma cinase, com as diferentes regiões de interação ⁵⁸ . Duas interações-chave são estabelecidas a partir do N-1 e do grupo amina da adenina (ligações de hidrogénio). | 16 |
| Figura 18: Plano geral de síntese. | 17 |
| Figura 19: Reagente chave no passo de guanidinilação. N',N''-diBoc-N-Tf-guanidina ou GN-Tf | 18 |
| Figura 20: Representação 2D e 3D dos triazoles intramoleculares 1,4-dissubstituído e 1,5-dissubstituído. | 27 |
| Figura 21: Representação dos SET1 e 2, contendo 2146 e 2141 compostos, respetivamente. | 38 |
| Figura 22: Representação do SET3. No total o SET3 contém 106 compostos. | 38 |
| Figura 23: A – Sobreposição do composto 122368681 com o ATP (a lilás), no local de ligação do ATP da enzima 4EOR. B – Sobreposição do composto 122368681 com o ATP (a azul escuro), no local de ligação com o ATP da enzima 6B8J. | 41 |
| Figura 24: C – Sobreposição do composto A58 com o ATP (a amarelo), no local de ligação do ATP da enzima 4EOQ. D – Sobreposição do composto A58 com o ATP (a azul escuro), no local de ligação com o ATP da enzima 6B8J | 42 |
| Figura 25: E – Sobreposição do composto B10 com o ATP (roxo), no local de ligação do ATP da enzima 4EOS. F – Sobreposição do composto B10 com o ATP (a azul escuro), no local de ligação com o ATP da enzima 6B8J..... | 44 |
| Figura 26: G – Sobreposição do composto B54 com o ATP (azul escuro), no local de ligação do ATP da enzima 6B8J. H – Resíduos dos amino ácidos no local de ligação do ATP. | 44 |
| Figura 27: I – Sobreposição do composto C7 com o ATP (a azul), no local de ligação do ATP da enzima 4EOR. J – Sobreposição do composto C7 com o ATP (a azul escuro), no local de ligação com o ATP da enzima 6B8J. | 45 |
| Figura 28: Estrutura dos compostos que obtiveram melhores resultados nos estudos de <i>docking</i> molecular..... | 46 |
| Figura 29: Resultados obtidos por docking molecular das possíveis interação entre o composto A58 e a enzima CDK2 (PDB: 4EOQ) e sobreposição com as estabelecidas pelo ATP | 51 |

Índice de Esquemas

| | |
|--|----|
| Esquema 1: Mecanismo da reação de guanidinilação utilizando o processo descrito na bibliografia | 18 |
| Esquema 2: Mecanismo presente na reação de Staudinger | 19 |
| Esquema 3: Mecanismo da reação de <i>Click-chemistry</i> , utilizando azida de benzilo e A-21/CuI. | 20 |
| Esquema 4: Mecanismo da reação de Arbuzov | 20 |
| Esquema 5: Mecanismo da reação Staudinger-Fosfito | 20 |
| Esquema 6: Mecanismo da <i>N</i> -glicosilação – Acoplamento de uma nucleobase sililada a um acetato de glicosilo usando TMSOTf como ácido de Lewis. | 21 |
| Esquema 7: Síntese das 5-azido-xilofuranoses 20 e 21 . Reagentes e condições: a) 1.2eq NaH, 1.2eq RBr , DMF; b) AcOH 76% aq.; c) 1.5eq NaIO ₄ , THF/H ₂ O (3:1); d) 1.5eq NaBH ₄ , EtOH/H ₂ O (2:1); e) 2eq TsCl, py; f) 3eq NaN ₃ , DMF, 80°C. | 23 |
| Esquema 8: Síntese das 5-azido xilofuranoses 27 e 28 . Reagentes e condições: a) AcOH 60% aq.; b) 1.5eq NaIO ₄ , THF/H ₂ O (3:1); c) 1.5eq NaBH ₄ , EtOH/H ₂ O (2:1); d) 2eq TsCl, py; e) 3eq NaN ₃ , DMF, 80°C; f) 1.2eq NaH, 1.2eq RBr , DMF; | 24 |
| Esquema 9: Síntese dos guanidino açúcares 26 , 27 e 28 | 25 |
| Esquema 10: Síntese dos guanidino açúcares 26 , 27 , 29 e 30 - Reação de Staudinger. | 26 |
| Esquema 11: Ciclização térmica intramolecular do composto 25 | 27 |
| Esquema 12: Síntese do composto 32 | 29 |
| Esquema 13: Síntese do composto 37 | 29 |
| Esquema 14: Síntese dos compostos 35 , 36 e 37 | 30 |
| Esquema 15: Síntese dos compostos 39 e 41 . Reagentes e condições: a) 1.2eq BnN ₃ , CuI/A-21, DCM; b) 2eq TsCl, py; c) 3eq NaN ₃ , DMF, 80°C; d) 5eq P(OEt) ₃ , DCM; e) 2eq CBr ₄ , 2eq PPh ₃ , DCM. f) P(OEt) ₃ , 110°C; g) 1.1eq PBr ₃ , DCM, 0°C. | 31 |
| Esquema 16: Síntese do composto 42 | 31 |
| Esquema 17: Síntese dos compostos 43 e 44 – Hidroboração-oxidação. a) i. NaBH ₄ , BF ₃ EtO ₂ , THF, 30°C; ii. NaOH, 5%aq, H ₂ O ₂ . b) 2eq teobromina ou 2-acetoamido-6-cloropurina, 2eq PPh ₃ , 2eq DEAD, THF. | 32 |
| Esquema 18: Síntese de (bromometil)triazoles 45-48 | 33 |
| Esquema 19: Síntese dos análogos contendo (triazolil)metil fosfonato 1,4-dissubstituídos (49 e 50). | 33 |

| | |
|--|----|
| Esquema 20: Síntese dos análogos contendo (triazolil)metil fosfonato 1,5-dissubstituído (51)..... | 34 |
| Esquema 21: Síntese dos análogos contendo (amino)metil triazoles 52-55..... | 35 |
| Esquema 22: Síntese dos análogos contendo (triazolil)metil fosforamidato 1,4 dissubstituídos 56 e 57..... | 35 |
| Esquema 23: Síntese dos análogos contendo (triazolil)metil fosforamidato 1,5-dissubstituído (58)..... | 36 |
| Esquema 24: Síntese dos compostos 61 e 62..... | 37 |

Índice de Tabelas

Tabela 1: Energias relativas obtidas para os diferentes regioisômeros, considerando clorofórmio ou tolueno como solvente. As energias foram calculadas tomando como zero o regioisômero 1,5 disubstituído.....28

Tabela 2: Valores obtidos para o *docking* dos SET1 e SET2. O símbolo # corresponde ao *rank* do composto. Os valores obtidos para a afinidade encontram-se entre parêntesis e em itálico (Kcal/mol). ID – corresponde à numeração do composto ou ao CID (compostos da PubChem). Os inibidores correspondes às estruturas cristalinas de cada enzima ou o ATP encontram-se a negrito.39

Tabela 3: Valores obtidos para o SET3. O símbolo # corresponde ao *rank* do composto. Os valores obtidos para a afinidade encontram-se entre parêntesis e em itálico (Kcal/mol). ID – corresponde à numeração do composto ou ao CID (compostos da PubChem). Os inibidores correspondes às estruturas cristalinas de cada enzima ou o ATP encontram-se a negrito.40

Índice de Anexos

| | |
|---|-----------|
| Anexo A..... | 99 |
| A1 – Espetros de RMN dos compostos sintetizados..... | 99 |
| A1.1. Espetros de RMN do composto 5 | 99 |
| A1.2. Espetros de RMN do composto 6 | 101 |
| A1.3. Espetros de RMN do composto 7 | 103 |
| A1.4. Espetros de RMN do composto 8 | 105 |
| A1.5. Espetros de RMN do composto 9 | 107 |
| A1.6. Espetros de RMN do composto 12 | 109 |
| A1.7. Espetros de RMN do composto 13 | 111 |
| A1.8. Espetros de RMN do composto 14 | 113 |
| A1.9. Espetros de RMN do composto 16 | 115 |
| A1.10. Espetros de RMN do composto 17 | 117 |
| A1.11. Espetros de RMN do composto 18 | 118 |
| A1.12. Espetros de RMN do composto 23 | 120 |
| A1.13. Espetros de RMN do composto 24 | 120 |
| A1.14. Espetros de RMN do composto 25 | 122 |
| A1.15. Espetros de RMN do composto 26 | 124 |
| A1.16. Espetros de RMN do composto 27 | 126 |
| A1.17. Espetros de RMN do composto 28 | 128 |
| A1.18. Espetros de RMN do composto 29 | 130 |
| A1.19. Espetros de RMN do composto 30 | 132 |
| A1.20. Espetros de RMN do composto 31 | 134 |
| A1.21. Espetros de RMN do composto 32 | 137 |
| A1.22. Espetros de RMN do composto 33 | 139 |
| A1.23. Espetros de RMN do composto 34 | 142 |
| A1.24. Espetros de RMN do composto 35 | 144 |

| | |
|---|------------|
| A1.25. Espetros de RMN do composto 36 | 147 |
| A1.26. Espetros de RMN do composto 37 | 149 |
| A1.27. Espetros de RMN do composto 38 | 152 |
| A1.28. Espetros de RMN do composto 39 | 154 |
| A1.29. Espetros de RMN do composto 40 | 156 |
| A1.30. Espetros de RMN do composto 41 | 158 |
| A1.31. Espetros de RMN do composto 42 | 160 |
| A1.32. Espetros de RMN do composto 43 | 162 |
| A1.33. Espetros de RMN do composto 44 | 164 |
| A1.34. Espetros de RMN do composto 45 | 167 |
| A1.35. Espetros de RMN do composto 46 | 169 |
| A1.36. Espetros de RMN do composto 47 | 172 |
| A1.37. Espetros de RMN do composto 48 | 174 |
| A1.38. Espetros de RMN do composto 49 | 177 |
| A1.39. Espetros de RMN do composto 50 | 180 |
| A1.40. Espetros de RMN do composto 51 | 183 |
| A1.41. Espetros de RMN do composto 52 | 186 |
| A1.42. Espetros de RMN do composto 53 | 188 |
| A1.43. Espetros de RMN do composto 54 | 190 |
| A1.44. Espetros de RMN do composto 55 | 193 |
| A1.45. Espetros de RMN do composto 56..... | 195 |
| A1.46. Espetros de RMN do composto 57 | 198 |
| A1.47. Espetros de RMN do composto 58 | 201 |
| A1.48. Espetros de RMN do composto 59..... | 204 |
| A1.49. Espetros de RMN do composto 60 | 206 |
| A1.50. Espetros de RMN do composto 61 | 209 |
| A1.51. Espetros de RMN do composto 62 | 212 |
| Anexo B | 215 |
| B1 – Numeração dos compostos em estudo | 215 |

| | |
|---|------------|
| B2 – Estrutura dos compostos da PubChem com os respectivos CID e dos inibidores das enzimas estudadas..... | 218 |
| B3 – Imagens geradas pelo PyMOL | 219 |

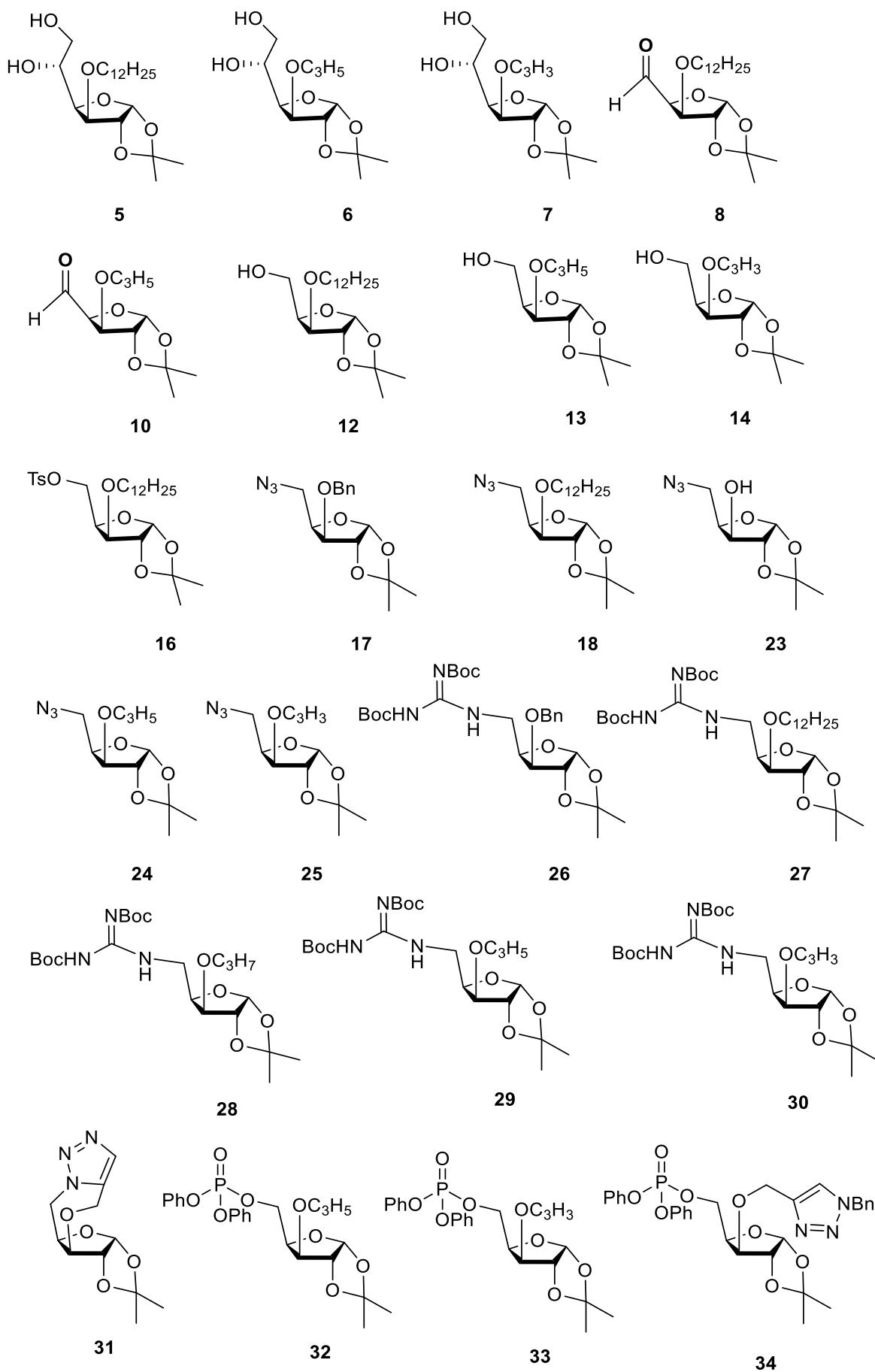
Abreviaturas e Símbolos

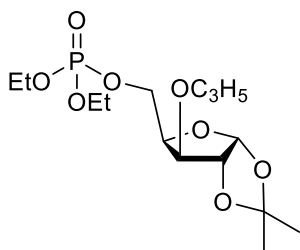
| | |
|-----------------------------------|--|
| δ | Desvio químico |
| $^{\circ}\text{C}$ | Grau Celsius |
| $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ | Rotação específica |
| Ac | Acetilo |
| AcOH | Ácido acético |
| Ac ₂ O | Anidrido acético |
| AcOEt | Acetato de etilo |
| ATP | Adenosina Trifosfato |
| BSA | <i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)acetamida |
| BF ₃ .OEt ₂ | Complexo de trifluoreto de boro-éter dietílico |
| Bn | Benzilo |
| Boc | Tert-Butiloxicarbonil |
| CH ₃ CN | Acetonitrilo |
| COSY | Correlation Spectroscopy 2D NMR |
| Cq | Carbono Quaternário |
| ¹³ C-RMN | Ressonância Magnética Nuclear de Carbono |
| d | Dupleto |
| DAG | 1,2:5,6-di-O-isopropilideno- α -D-glucofuranose |
| DCM | Diclorometano |
| dd | Dupleto duplo |
| DMF | <i>N,N</i> -Dimetilformamida |
| DMAP | <i>N,N</i> -dimetil-4-aminopiridina |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| eq | Equivalentes |

| | |
|--------------------|---|
| Et ₃ N | Trietilamina |
| G | Gramas |
| GN | Guanidina |
| GN-Tf | N',N''-diBoc-N-Tf-guanidina |
| h | Horas |
| Hex | Hexano |
| ¹ H-RMN | Ressonância Magnética Nuclear de Protão |
| HMBC | Heteronuclear Multiple Bond Correlation |
| HMQC | Heteronuclear Multiple Quantum Bond Coherence |
| Hz | Hertz |
| <i>J</i> | Constante de acoplamento |
| m | Multiplete |
| Me | Metilo |
| MeOH | Metanol |
| mg | Miligrama |
| min | Minutos |
| mL | Mililitro |
| mmol | Milimol |
| Ph | Fenilo |
| P.f. | Ponto de fusão |
| ppm | Partes por milhão |
| Py | Piridina |
| q | Quarteto |
| Rf | Factor de Retenção |
| RMN | Ressonância Magnética Nuclear |
| RNA | Ácido ribonucleico |

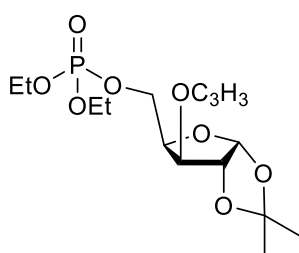
| | |
|--------|--|
| s | Singuleto |
| TLC | Thin layer chromatography |
| t | Tripleto |
| t.a. | Temperatura ambiente |
| THF | Tetrahidrofurano |
| TMSOTf | Trimetilsilil trifluorometanosulfonato |
| TrCl | Cloreto de Tritilo |
| TsCl | Cloreto de Tosilo |
| UV | Ultravioleta |

Lista dos compostos sintetizados

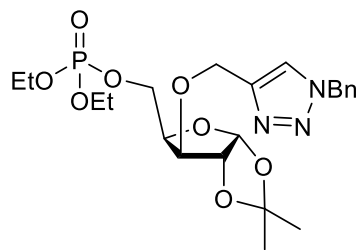




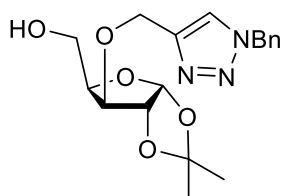
35



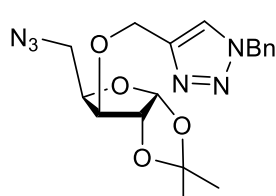
36



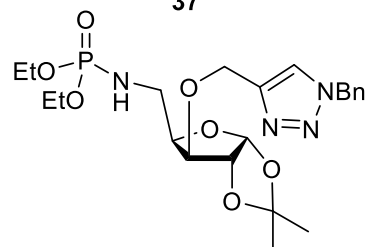
37



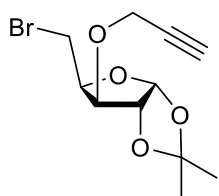
38



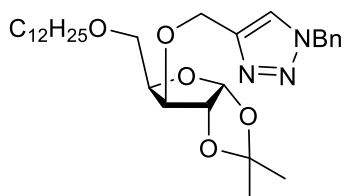
39



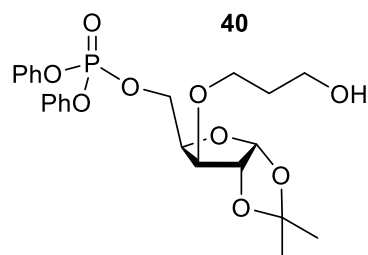
40



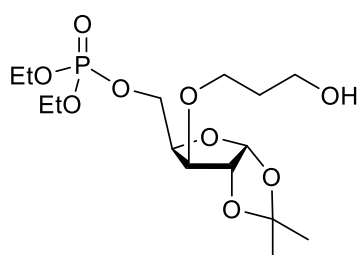
41



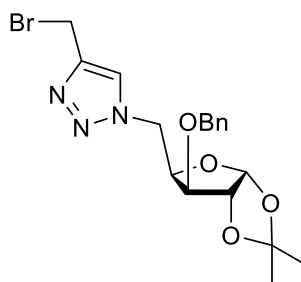
42



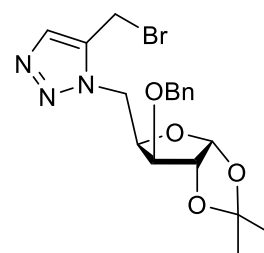
43



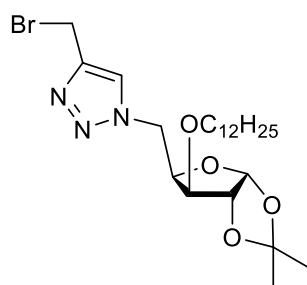
44



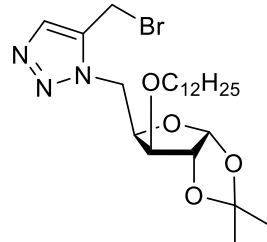
45



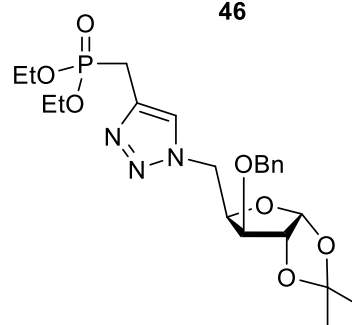
46



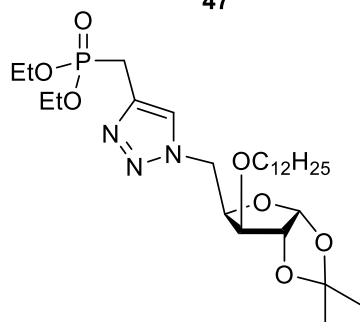
47



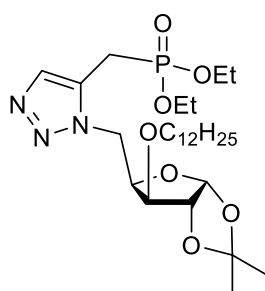
48



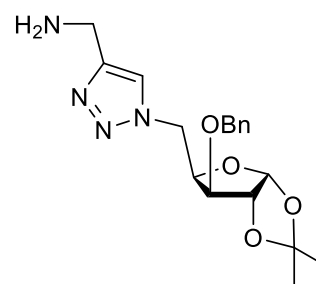
49



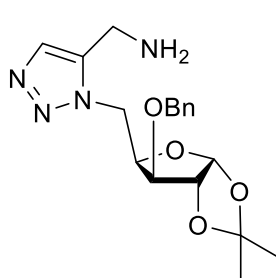
50



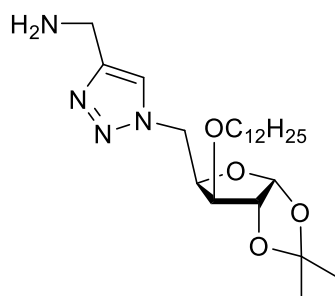
51



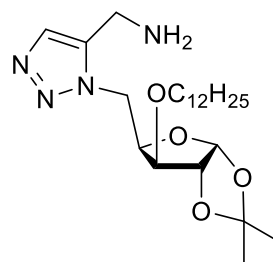
52



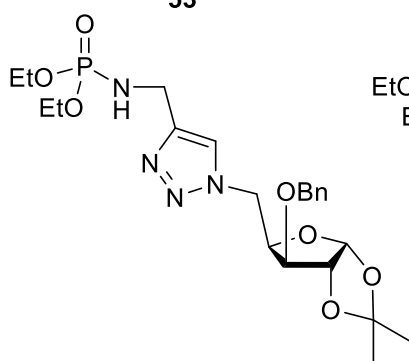
53



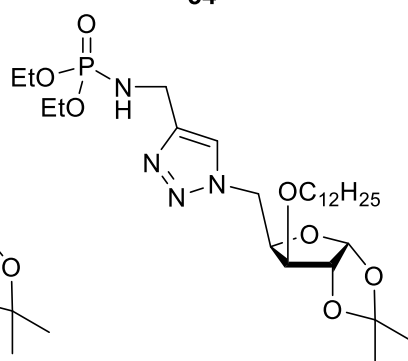
54



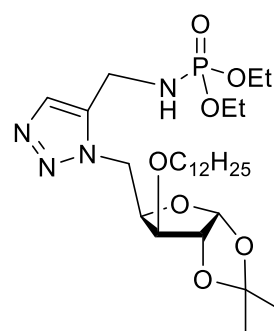
55



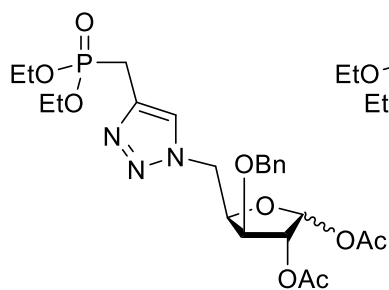
56



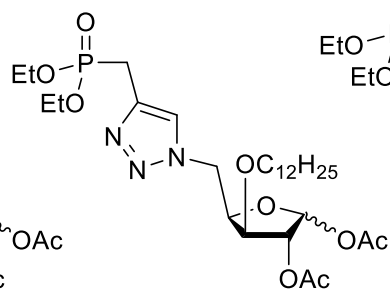
57



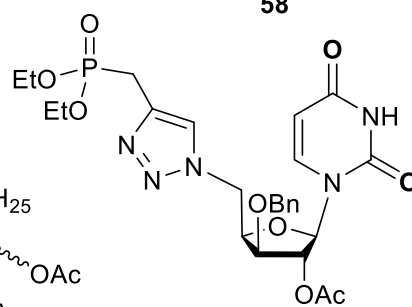
58



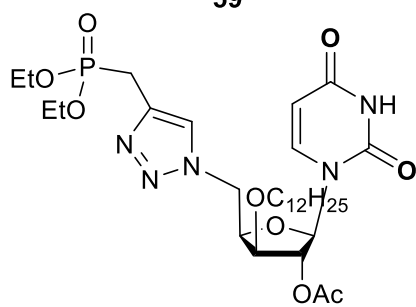
59



60

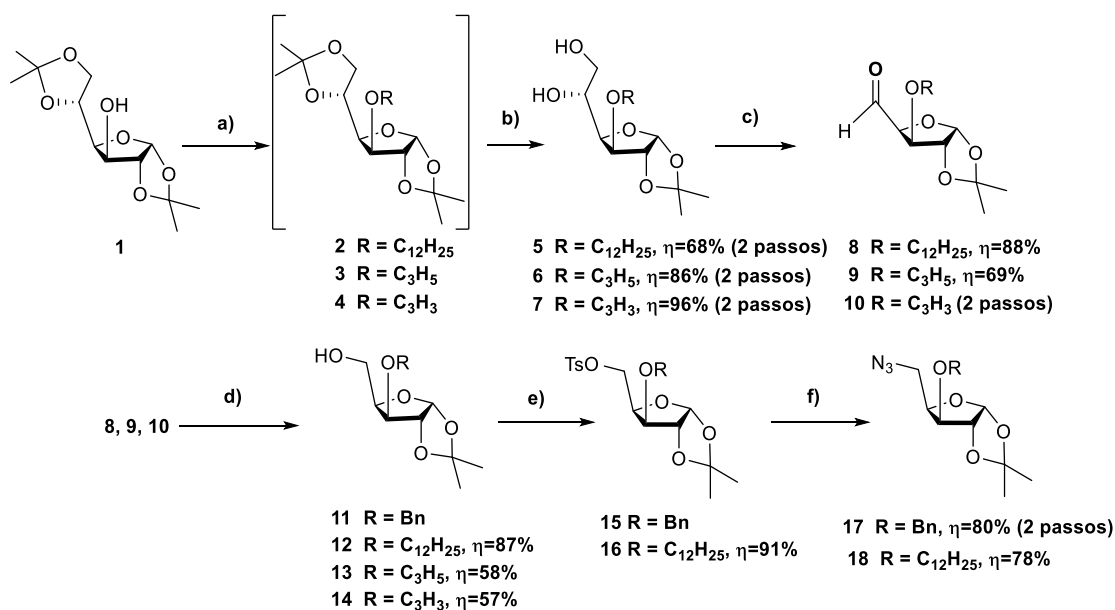


61

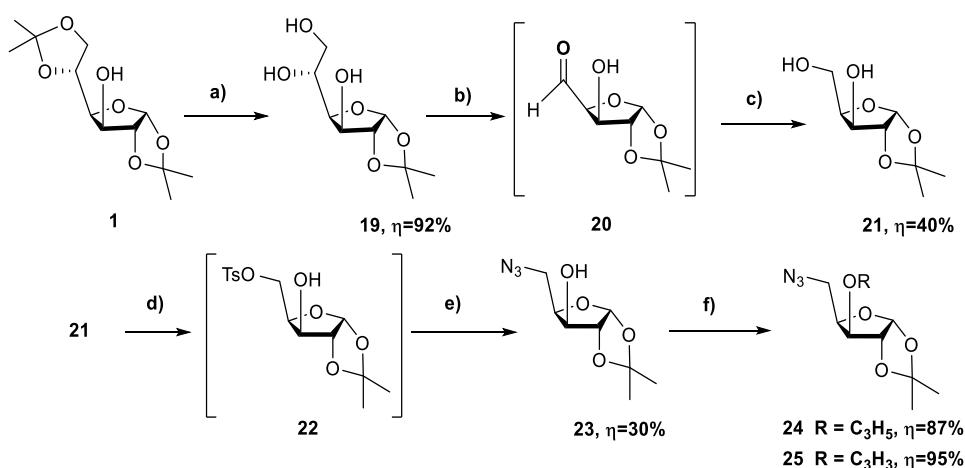


62

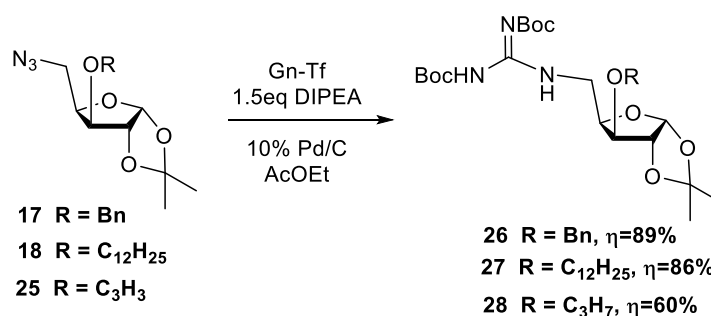
Esquemas reacionais

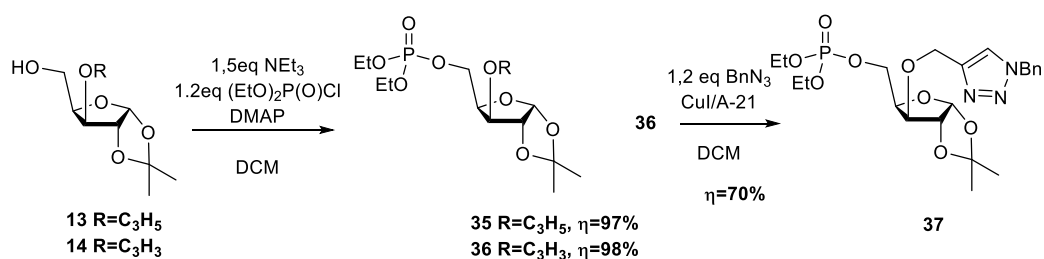
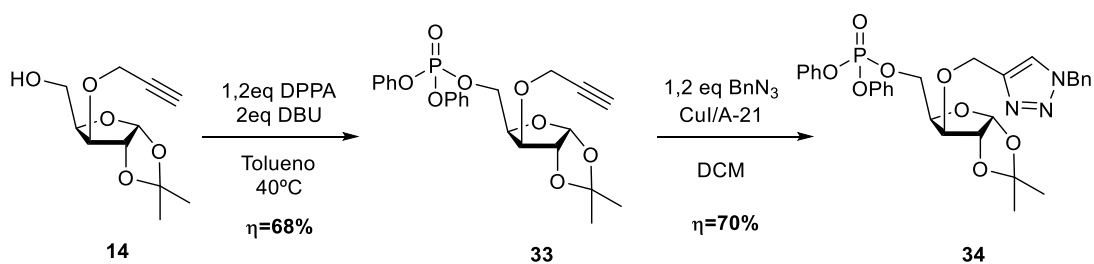
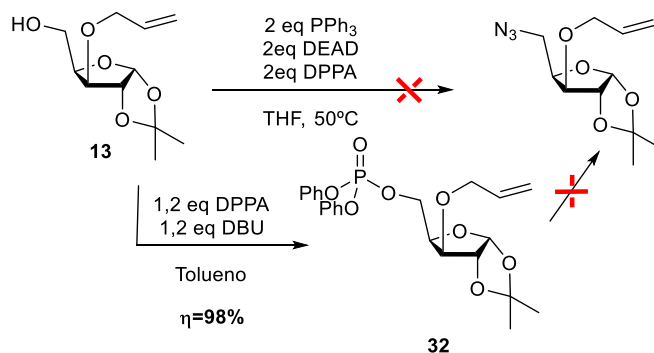
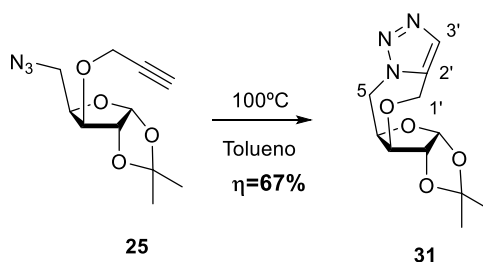
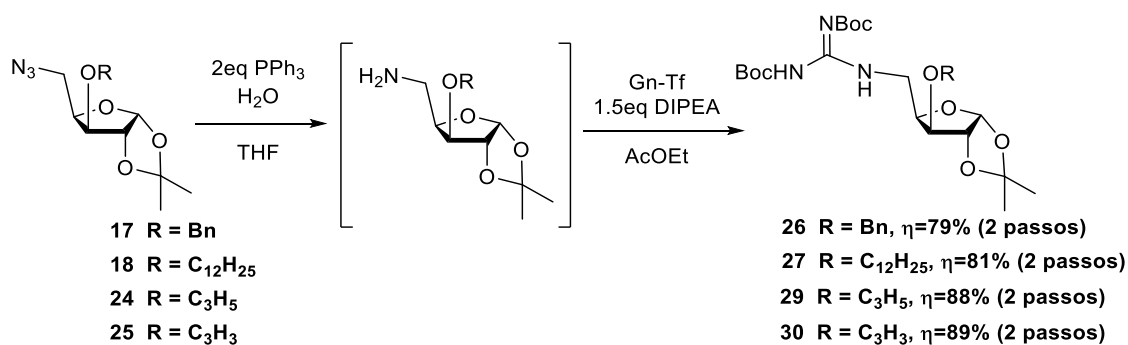


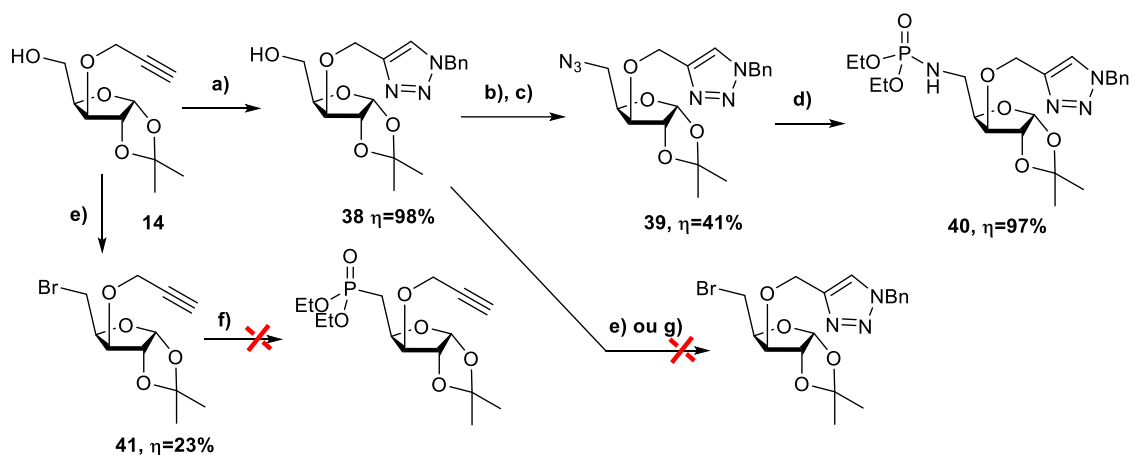
Reagentes e condições: a) 1.2eq NaH, 1.2eq RBr, DMF; b) AcOH 76% aq.; c) 1.5eq NaIO₄, THF/H₂O (3:1); d) 1.5eq NaBH₄, EtOH/H₂O (2:1); e) 2eq TsCl, py; f) 3eq NaN₃, DMF, 80°C.



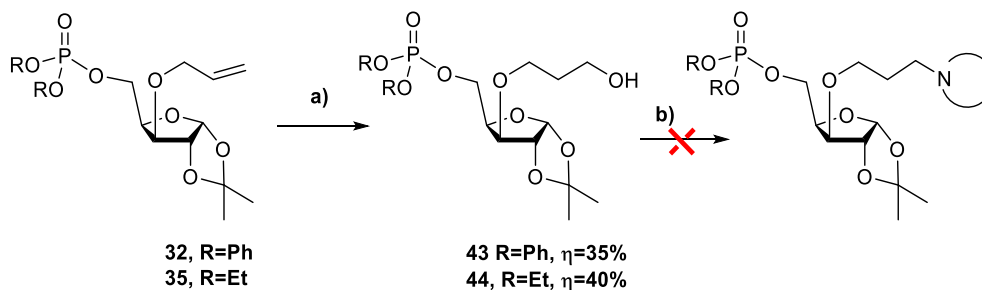
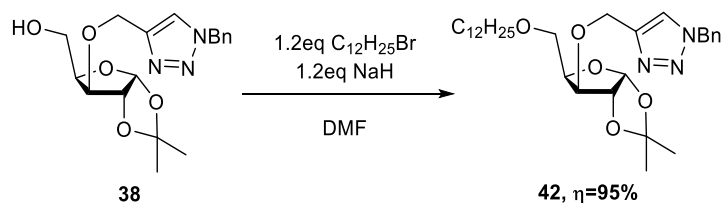
Reagentes e condições: a) AcOH 60% aq.; b) 1.5eq NaIO₄, THF/H₂O (3:1); c) 1.5eq NaBH₄, EtOH/H₂O (2:1); d) 2eq TsCl, py; e) 3eq NaN₃, DMF, 80°C; f) 1.2eq NaH, 1.2eq RBr, DMF;



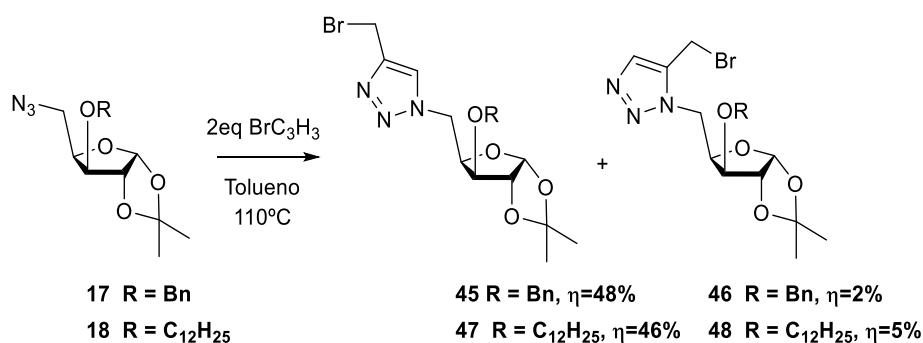


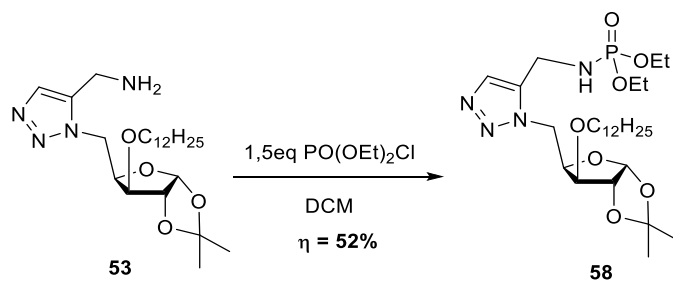
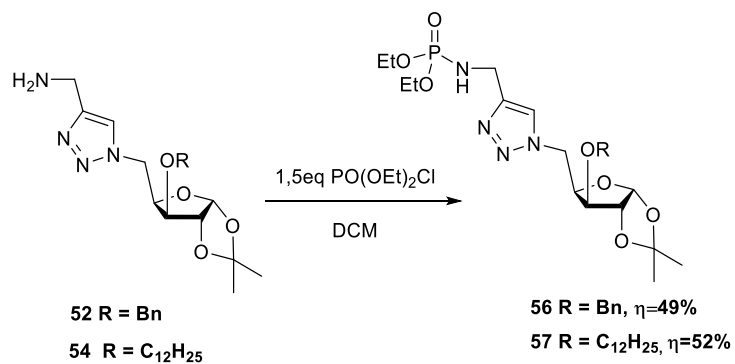
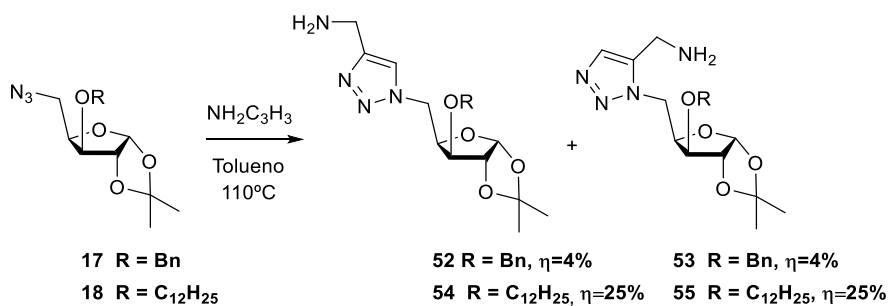
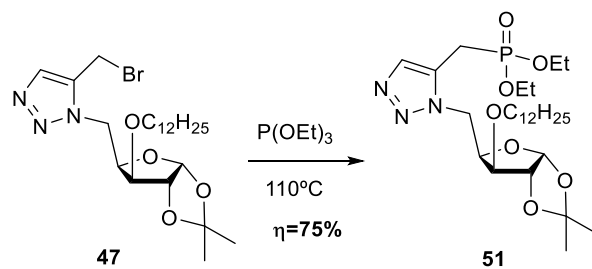
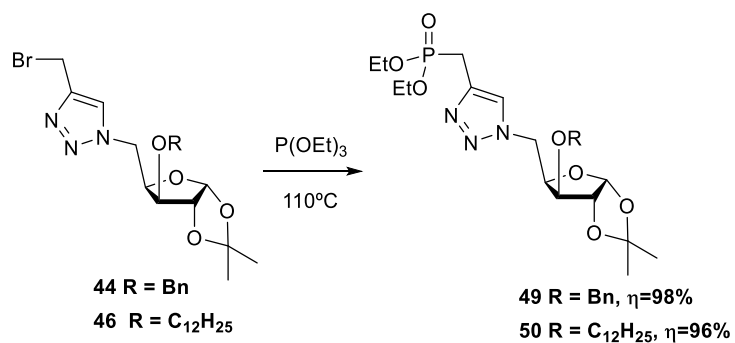


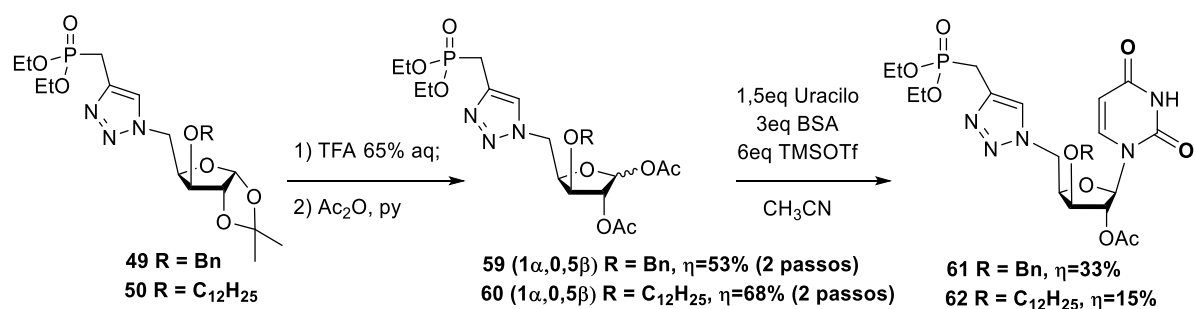
Reagentes e condições: a) 1,2eq BnN_3 , CuI/A-21 , DCM; b) 2eq TsCl , py; c) 3eq NaN_3 , DMF, 80°C ; d) 5eq $\text{P}(\text{OEt})_3$, DCM; e) 2eq CBr_4 , 2eq PPh_3 , DCM. f) $\text{P}(\text{OEt})_3$, 110°C ; g) 1.1eq PBr_3 , DCM, 0°C .



Reagentes e condições: a) i. NaBH_4 , BF_3Et_2 , THF, 30°C ; ii. NaOH , 5%aq, H_2O_2 . b) 2eq teobromina ou 2-acetoamido-6-cloropurina, 2eq PPh_3 , 2eq DEAD, THF.







Capítulo 1

Introdução

O objetivo principal deste trabalho consistiu na síntese de novos análogos de nucleósidos e nucleótidos, explorando o seu potencial de inibição de cinases - CDK2 e a GSK3 β - através de *docking* molecular.

1. Introdução

1.1. Cinases

As cinases são enzimas que transferem grupos fosfato de moléculas doadoras de fosfato de elevada energia potencial, como o ATP (trifosfato de adenosina ou adenosina trifosfato), para determinadas moléculas alvo (substrato), sendo este processo denominado fosforilação. Todas as cinases necessitam de um ião metálico divalente como o Mg²⁺ ou Mn²⁺ para a transferência do grupo fosfato. A fosforilação de uma molécula como, por exemplo, uma proteína, lípido ou um carbo-hidrato, afeta a sua atividade e reatividade, sendo crucial em inúmeros processos biológicos por exemplo, em processos de sinalização celular, regulação proteica, transporte celular, processos de secreção, entre outros. Por outro lado, as fosfatases são enzimas que fazem a reação inversa das cinases, removendo um grupo fosfato, ou seja, promovem a desfosforilação.

A fosforilação, é desde modo, mecanismo mais comum utilizado em células para regular enzimas e proteínas estruturais e como várias doenças estão associadas a anormalidades na fosforilação de proteínas, os inibidores de cinases e fosfatases têm tido um grande interesse na descoberta de novos fármacos^{1,2}.

No início do século 21, o aparecimento do inibidor da tirosina cinase, o Imatinib (**figura 1**), como um novo tipo de fármaco para o cancro, revolucionou e validou as proteína cinases como alvos biológicos para a terapia do cancro. Este inibidor é utilizado atualmente para o tratamento da leucemia mielóide crónica (LMC), tumores estromais gastrointestinais (GISTs) e diversas outras doenças malignas, sendo também utilizado no tratamento de tumores que apresentam mutações relacionadas com a tirosina cinase³.

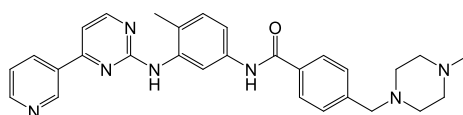


Figura 1: Imatinib (Glivec®), o primeiro inibidor de cinases⁴.

Na LMC, o cromossoma Filadélfia contém a fusão do gene ABL1 com o gene BCR, dando origem a uma proteína híbrida, que sinaliza a tirosina cinase, estando sempre ativada, o que acaba por induzir uma divisão celular incontrollável⁵. Deste modo, como a atividade enzimática

catalisada por uma tirosina cinase consiste na transferência do fosfato terminal do ATP para resíduos de tirosina, o Imatinib funciona ligando-se próximo do sítio de ligação do ATP, alterando a conformação de tal forma que inibe a atividade enzimática desta proteína, de forma semi-competitiva⁶. Deste modo, este fármaco acaba assim por diminuir a proliferação celular descontrolada.

1.1.1. CDKs e o seu papel na divisão celular

As cinases dependentes de ciclina (CDKs) são proteínas cinases Ser/Thr, que se tornam ativas quando se associam com suas respectivas subunidades de ciclina. Até ao momento, mais de 13 CDKs e 25 ciclinas foram descobertas e suas funções biológicas não estão completamente compreendidas⁷.

As CDKs são reguladores-chave do ciclo celular⁸ e a regulação adequada da atividade de CDK é crucial para a execução ordenada das fases do ciclo (**figura 2**). Um grande número de neoplasias humanas mostra a expressão descontrolada de reguladores positivos de CDKs e / ou diminuição de reguladores negativos⁹. A expressão anormal de CDK2 / ciclina E foi detetada no cancro colorretal, do ovário, da mama e da próstata. Deste modo, as cinases envolvidas na divisão celular poderão ser um alvo terapêutico que ajude a travar o crescimento descontrolado das células tumorais.

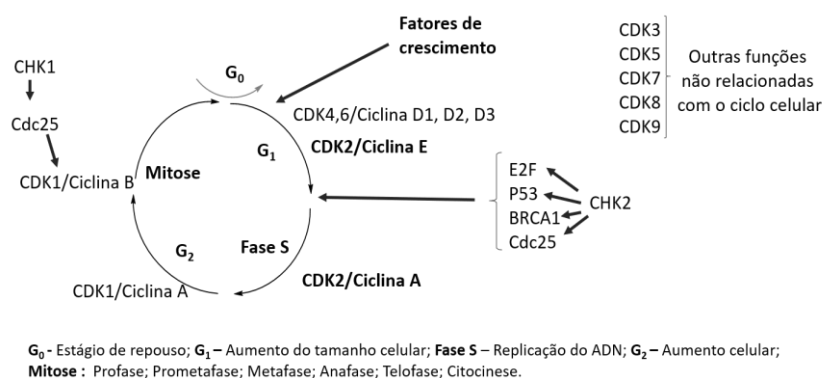


Figura 2: Regulação do ciclo celular por CDKs: o diagrama representativo contendo as diferentes fases do ciclo de divisão celular e o papel das CDKs juntamente com as suas respetivas ciclinas.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (World Health Organization – WHO), 8,8 milhões de pessoas no mundo morreram de cancro em 2015. O cancro é caracterizado pelo crescimento e proliferação descontrolado das células, existindo uma criação rápida de células anormais que invade várias partes do corpo e que se espalha para outros órgãos através da circulação sanguínea, criando metástases. Essas metástases são a maior causa de morte relacionada com o cancro,

devido à sua capacidade de crescimento celular acelerado e eficaz e que têm a capacidade de afetar órgãos vitais.

Apesar de existirem vários tratamentos utilizados atualmente, como a cirurgia, radioterapia (radiação ionizante que danifica o DNA – ácido desoxirribonucleico – das células cancerígenas), a quimioterapia (administração de fármacos) e/ou imunoterapia (que consiste na ativação do sistema imunitário de forma a travar o cancro: administração de vacinas como a Provenge®¹⁰, ou anticorpos), os efeitos secundários e, no caso da quimioterapia em específico, a criação de mecanismos de resistência por parte das células cancerígenas aos fármacos utilizados, são dois dos mais graves problemas associados a estes tratamentos. Existem inúmeros mecanismos de resistência à quimioterapia, como a diminuição da entrada do fármaco nas células (influxo), pela diminuição da expressão/ou subexpressão de proteínas transportadoras, a própria modificação da droga através de enzimas celulares, a diminuição da reparação do DNA danificado, inibição da morte celular, efluxo de drogas (bombas de efluxo como a P-gp), alteração do alvo terapêutico e epigenéticas (sobreexpressão de genes, etc)¹¹, entre outras, o que acabam por diminuir de forma drástica a eficácia dos fármacos administrados. Desta forma, novas abordagens terapêuticas, incluindo diferentes alvos biológicos podem ser uma resposta a estes problemas.

1.1.2. CDK2 – Cinase dependente de ciclina 2

Esta cinase contém uma subunidade catalítica cuja atividade é restrita à fase G1-S do ciclo celular e é essencial para a transição G1/S. Esta enzima é regulada pela ciclina E ou A, sendo que a primeira se liga na fase G1, sendo necessário para a transição da fase G1 para a fase S, enquanto que a ciclina A é necessária para o progresso na fase S. Para além disso, também é regulada através de fosforilações. A CDK2 monomérica é inativa devido à disposição dos resíduos do sítio ativo que é dependente da pose da hélice-C e da conformação do segmento de ativação. Deste modo, a ligação da ciclina A e a fosforilação de Thr160 no segmento de ativação reorganizam o local ativo da CDK2 para orientar os resíduos chave de ligação e catalíticos de ATP (**figura 3**), criando assim o local de ligação¹².

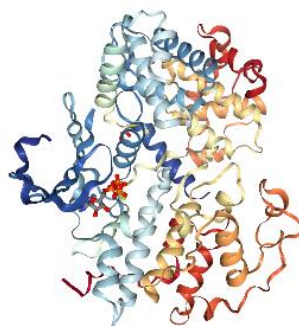


Figura 3: Estrutura da cinase dependente de ciclina 2 (CDK2), complexada com ATP (PDB:4EOQ).^{13,14}

São várias as evidências do papel importantíssimo da CDK2. Por exemplo, a CDK2-ciclina A durante a fase S inicial promove as fosforilações de vários substratos endógenos para permitir a replicação do DNA e a inativação do fator de transcrição G1 E2F. A inativação de E2F é vital para a conclusão da fase S, enquanto a sua existência na ausência de CDK2-ciclina A pode levar à apoptose celular. Portanto, a citotoxicidade pode ser alcançada pela inibição da CDK2¹⁵.

Para além disso, demonstrou-se que os inibidores de CDK induzem a apoptose em diferentes linhas celulares tumorais¹⁶. Deste modo, inibidores de CDK têm o potencial de ampliar o grupo de agentes antineoplásicos. Existem atualmente vários ensaios clínicos com inibidores de CDK, incluindo o flavopiridol, UCN-01, CYC202 e dinaciclib (**figura 4**). Os compostos têm uma grande citotoxicidade contra complexos de enzimas CDK recombinantes e células tumorais em ensaios *in vitro* e *in vivo*.⁴

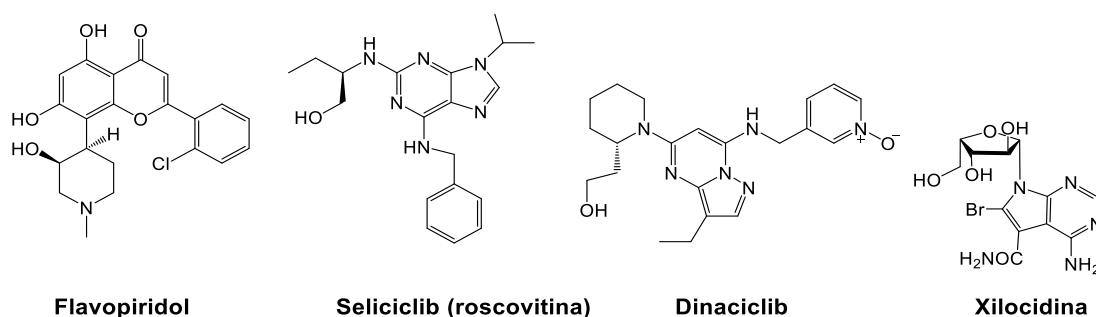


Figura 4: Inibidores de CDKs reportados na literatura: flavopiridol¹⁷, seliciclib (roscovitina)¹⁸, dinaciclib¹⁹ e xilocidina²⁰.

O flavopiridol foi o primeiro inibidor da CDKs a ser testado em ensaios clínicos¹⁷ e, tal como outros compostos como o seliciclib, inibe várias CDKs como a CDK2, CDK7 e CDK9, não mostrando seletividade. A xilocidina é um análogo de nucleósido, apresentando também excelente inibição na CDK2, mas também noutras CDKs. Porém, este composto demonstrou ter citotoxicidade apenas em células SNU-354 e SNY-709, podendo assim, ser um possível candidato para o carcinoma hepatocelular²¹. No entanto, o único composto que passou à fase 3 dos ensaios clínicos foi o dinaciclib, que inibe a CDK1, CDK2, CDK5 e CDK9 com concentrações que inibem 50% da atividade enzimática (IC₅₀, concentração inibitória média) na ordem dos nanomolar (4, 1, 1 e 4 nM, respetivamente), apesar dos efeitos secundários¹⁹. Porém, este composto mostrou e eficácia clínica em pacientes com leucemia linfocítica crónica e tumores sólidos²². Estes resultados demonstram uma vez mais que inibidores de CDKs têm o potencial de ser excelentes candidatos a novos fármacos.

1.1.3. GSK-3 β – Glicogénio sintase cinase 3 β

A glicogénio sintase cinase 3 (GSK-3) foi uma das primeiras cinases a ser identificada e estudada, inicialmente pela sua função na regulação da glicogénio sintase (GS). Porém, o interesse por esta enzima foi crescendo muito além do metabolismo do glicogénio e atualmente é conhecida por ocupar um papel principal em vários processos celulares e fisiológicos, incluindo a sinalização de Wnt e Hedgehog, transcrição, ação da insulina, divisão celular, resposta a danos do DNA, apoptose celular, diferenciação celular, funções neuronais, entre outros²³.

Existem duas isoformas desta enzima, a GSK-3 α e a GSK-3 β e, apesar de serem muito semelhantes estruturalmente, foram feitos estudos que comprovaram que a GSK-3 α não consegue compensar na totalidade a função da GSK-3 β , o que sugere que não são funcionalmente iguais. A GSK-3 β foi cristalizada recentemente²⁴ e, de forma geral, contém duas subunidades, uma subunidade pequena N-terminal, constituída principalmente por folhas β e uma subunidade grande C-terminal, constituída essencialmente por hélices- α (**figura 5**). O local de ligação ao ATP encontra-se localizado entre as duas subunidades.

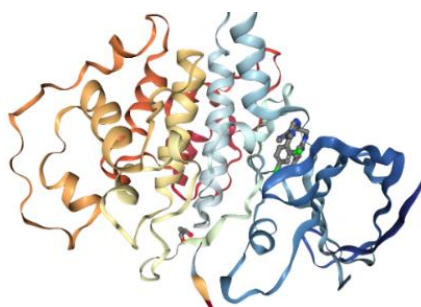


Figura 5: Estrutura da glicogénio sintase cinase 3beta (GSK-3 β) complexada com o inibidor 6-(2 – {[4-(2,4-diclorofenil)-5-(4-metil-1H-imidazol-2-il)pirimidin-2-il]amino}etilamino)piridina-3- carbonitrilo (PDB: 6B8J).^{13,14,25}

1.1.3.1. Diversidade de aplicações

Sais de lítio (LiX) têm sido utilizados em pacientes que sofrem de transtorno maníaco-depressivo (transtorno bipolar), como inibidor de GSK3 – identificada como sendo um dos principais alvos – apesar de, serem necessárias concentrações na ordem dos milimolar ($IC_{50}=2000\mu M$, competidor com Mg^{2+})²⁶. Apesar da sua eficácia, o lítio tem efeitos secundários indesejados e desta forma, outros potentes inibidores desta enzima poderiam representar uma excelente alternativa para o tratamento do transtorno bipolar. Deste modo, um grande conjunto de evidências suporta a ideia de que os inibidores farmacológicos da GSK-3 poderiam ser usados

para tratar várias doenças, incluindo a doença de Alzheimer e outras doenças neurodegenerativas, transtorno afetivo bipolar, diabetes e doenças causadas por parasitas unicelulares que expressam homólogos da GSK-3, entre outras²³.

A doença de Alzheimer é caracterizada por três eventos essenciais²⁷: 1) Na doença de Alzheimer de início precoce (predisposição genética para a doença, correspondendo a cerca de 13% dos casos), existe mutação de qualquer um dos genes que codifica presenilina-1 e presenilina-2 e a proteína precursora da beta amiloide (β -APP); 2) Acumulação extracelular de beta amiloide; e 3) Agregação intracelular de formas hiperfosforiladas de proteínas que se ligam e estabilizam microtúbulos, o que leva à agregação das mesmas e destruição dos neurónios. A GSK3 β foi descrita como estando presente em cada um destes processos: a sua atividade encontra-se aumentada em células de pacientes com doença de Alzheimer precoce, quando comparadas com células de controlo²⁸; a atividade da GSK-3 é necessária para a formação da beta amiloide a formação dos agregados tóxicos desta proteína nas células neuronais está relacionada com um aumento da atividade desta enzima²⁹; A GSK3 juntamente com a CDK5 e a cinase reguladora da afinidade de microtúbulos (MARK), são das mais importantes enzimas envolvidas na fosforilação anormal em sítios específicos na doença do Alzheimer. Deste modo, todos estes fatores juntos, indicam que a inibição da GSK3 é uma potencial estratégia terapêutica de forma a ajudar a combater estes principais eventos e retardar a demência associada a esta doença.

A diabetes tipo 2, que corresponde a 90% dos casos de diabetes, resulta na resistência associada à insulina. O papel central da GSK3 no metabolismo da glucose torna esta enzima um alvo promissor no controlo da hiperglicemia, sendo que a inibição da sua atividade pode representar um novo mecanismo para melhorar a diminuição da glucose no sangue. Ao contrário de outras proteínas cinases intracelulares conhecidas, a GSK3 encontra-se ativa em células em repouso e é inibida através da ação de sinais extracelulares, como a insulina, e da ativação de vias de sinalização celular. A insulina regula a acumulação de glicogénio, sendo que um aumento de insulina no sangue leva a um aumento do transporte de glucose para as células, aumentando assim a síntese de glicogénio. Nos diabéticos, poderão ocorrer problemas neste processo, resultando em menor armazenamento de glicogénio. Através da ação da insulina, a fosforilação da GS, o que desativa esta enzima e leva à redução da formação de glicogénio, é reduzida. Esta ação consiste no aumento da atividade da proteína fosfatase 1G (PP1G) e a inibição de cinases como a PKA e a GSK3.³⁰ A desregulação ou a sobreexpressão de GSK3 nestas células pode levar à resistência à insulina. Assim, a inibição da GSK3 em conjunto com a sinalização induzida pela insulina deverá aumentar a atividade da GS e melhorar a deposição de glicogénio em tecidos críticos que controlam a glucose, o que ajudará a regular os níveis de glucose no sangue.

Existem muitos inibidores reportados na literatura, mas a toxicidade, efeitos colaterais associados e preocupações com a absorção, distribuição, metabolismo e excreção desses inibidores afetam seu potencial clínico²³. Apesar disso, existem inibidores extremamente potentes (**figura 6**), como o CHIR 99021 (IC_{50} para GSK3 α e GSK3 β = 10 e 6,7 nM, respectivamente), não inibindo CDKs. O composto CHIR99201 potencia a auto-renovação de células estaminais embrionárias humanas e de ratinhos e a reprogramação de células somáticas em células estaminais, sendo utilizado para este efeito.³¹ A estaurosporina, por sua vez é um antibiótico, isolado em 1977 da bactéria *Streptomyces staurosporeus* e destaca-se pela excelente inibição desta enzima (IC_{50} para GSK3 α e GSK3 β = 15 e 89nM), porém, inibe também a CDK1 (IC_{50} para CDK1 = 6 nM). Por outro lado, o composto 6-bromoindirubin-3'-oxime (BIO), inibe seletivamente a GSK3 β (IC_{50} para GSK3 β = 5 nM), tendo sido reportado como tendo atividade antienvhecimento e anti-tumoral³². Desta forma, estes compostos demonstram o potencial terapêutico de inibidores desta enzima.

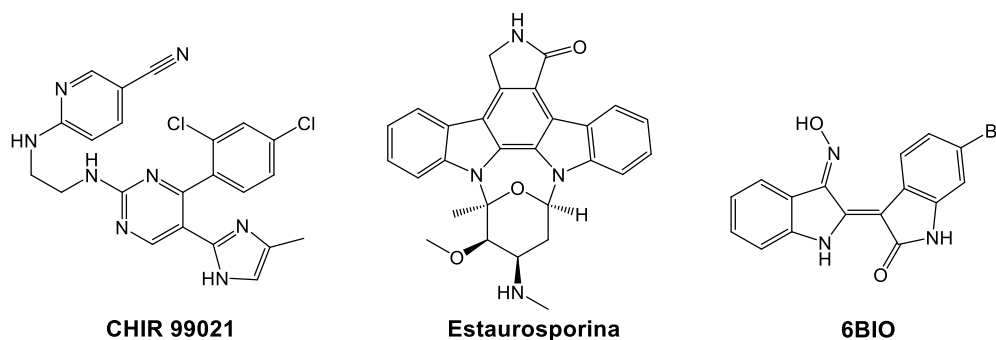


Figura 6: Inibidores de GSK reportados na literatura: CHIR 99021³³, estaurosporina³⁴ e 6-bromoindirubina-3'-oxima (6BIO)³².

1.2. Nucleósidos e Nucleótidos

Os nucleósidos são moléculas constituídas por um açúcar de 5 membros (ribose ou desoxirribose), estando substituído na posição anomérica por uma base azotada. Os nucleótidos são nucleósidos que contêm um ou mais grupos fosfato na posição 5 do açúcar, como mostra a **figura 7**, podendo ser chamados também de nucleósido mono, di ou trifosfato.

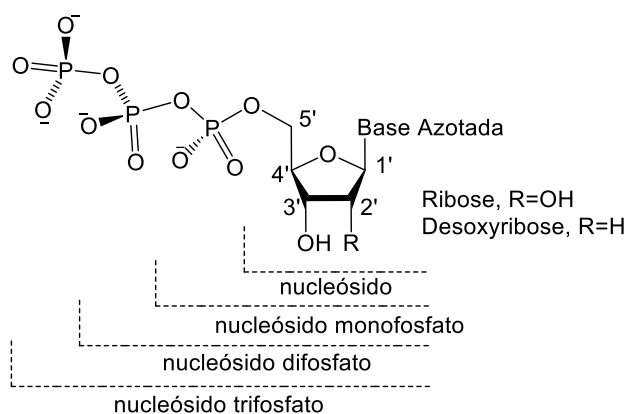


Figura 7: Estrutura geral de nucleósidos

O ATP é um exemplo de um nucleótido que contém três grupos fosfatos (nucleósido trifosfato) e cuja base azotada é a adenina. É uma molécula fundamental para a vida, responsável pelo armazenamento de energia nos seres vivos tendo também um papel crucial na sinalização intra e extracelular, síntese de DNA e RNA (ácido ribonucleico), síntese de proteínas, nos transportadores ABC, entre outros processos biológicos. Os vários tipos de bases azotadas encontram-se representadas na **figura 8**, sendo designadas por pirimidinas quando são constituídas por um anel pirimidínico, ou purinas, quando são constituídas por um anel pirimidínico fundido com um anel imidazólico.

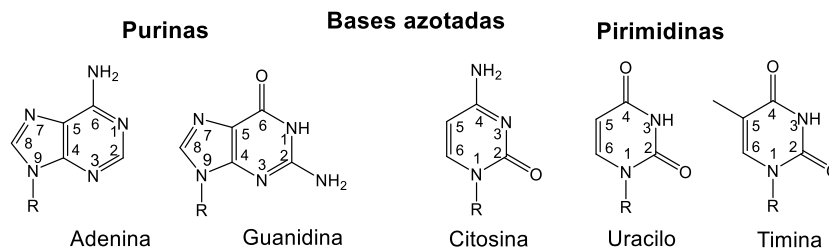


Figura 8: Representação das várias bases azotadas presentes nos nucleósidos naturais

Estas moléculas desempenham um papel extremamente importante nos processos biológicos, pois os nucleótidos são monómeros do DNA e RNA que contém a informação genética. Deste modo, o DNA é um polímero de nucleótidos, unidos através de ligações fosfodiéster (**figura 8**) e a sequência de bases azotadas ao longo da molécula de DNA constitui a informação genética que pode ser lida através da sua tradução, dando origem a um RNA mensageiro através de um processo chamado de transcrição. A informação traduzida resulta numa sequência linear de aminoácidos específica (proteína). Embora a maioria do RNA produzido seja utilizado na síntese de proteínas, algum RNA tem função estrutural, como por exemplo, o RNA ribossómico. Os genes são uma sequência específica de nucleótidos, presentes no DNA contido num cromossoma dentro do núcleo das células de um determinado indivíduo (46 cromossomas relativamente ao ser humano) e contém a informação genética sobre as características físicas desse

indivíduo bem como a expressão de proteínas fundamentais para o funcionamento do seu organismo.

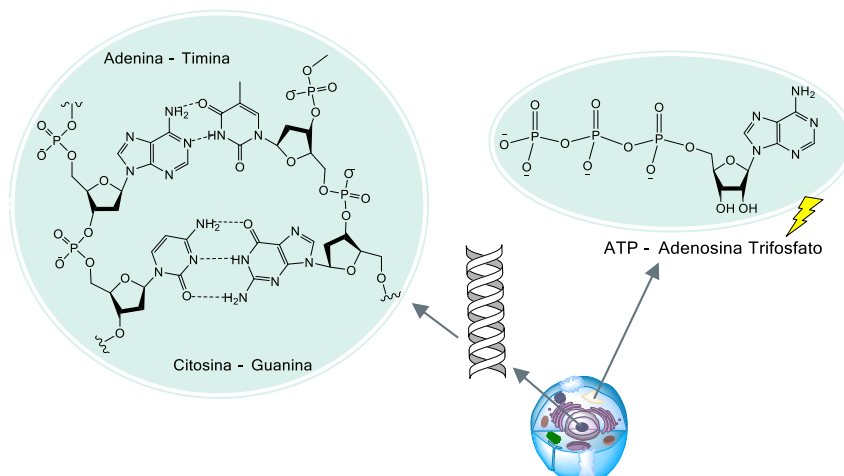


Figura 9: Representação geral do papel dos nucleótidos nas células: No núcleo, encontra-se presente o DNA – na imagem, destaca-se a união por ligações de hidrogênio entre duas cadeias de DNA - complementaridade de bases; O ATP, encontra-se presente dentro (e fora) das células, responsável pelo armazenamento de energia e desempenhando um papel crucial em inúmeros processos biológicos.

1.2.1. Análogos de Nucleósidos e Nucleótidos

Os análogos de nucleótidos e nucleósido, atuam como antimetabolitos de ácidos nucleicos, pela sua capacidade de mimetizar os nucleótidos e nucleósidos fisiológicos, podendo ser incorporados no DNA ou RNA – impedindo assim a formação da cadeia de DNA ou RNA o que impede a sua replicação, levando à indução da apoptose celular ou inibindo a replicação viral. Também conseguem inibir as enzimas envolvidas no metabolismo de nucleótidos e na síntese de ácidos nucleicos, podendo também inibir outras enzimas dependentes de nucleósidos/nucleótidos (como as cinases).

Um número significativo de análogos de nucleósidos são utilizados clinicamente para tratar o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), Hepatite B e C. Os compostos presentes na **figura 10**, encontram-se na lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial de Saúde, onde se encontram os medicamentos mais eficazes e seguros utilizados atualmente.

Dentro dos compostos apresentados, a citarabina (ara-C, arabinosilcitosina), é utilizado em quimioterapia no tratamento da leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia mielogénica crónica (LMC) e linfoma não-Hodgkin. Este composto interfere na síntese do DNA, convertendo-se em trifosfato de arabinosilcitosina, incorporando-se na cadeia crescente de DNA e interrompendo a sua síntese quando o ciclo celular se mantém na fase S (síntese do DNA). Deste modo, as células em rápida divisão, que requerem replicação de DNA

para mitose, são mais afetadas. Também inibe as RNA polimerases e as enzimas ribonucleotídeo redutase necessárias para a síntese do DNA. É transportado para a célula principalmente pelo transportador hENT-1, o que acaba por ser suscetível a mecanismos de resistência das células cancerígenas³⁵, como a diminuição destes transportadores. Para além disso, este composto é rapidamente desaminado pela citidina desaminase, dando origem ao respetivo nucleósido de uracilo (inativo). A citarabina-5'-monofosfato também é desaminada pela desoxicitidilato desaminase, levando ao análogo inativo da uridina-5'-monofosfato. A fludarabina, também é utilizada no tratamento de leucemia e linfoma, mas atua inibindo a síntese de DNA ao inibir a ribonucleotídeo redutase e a DNA polimerase.

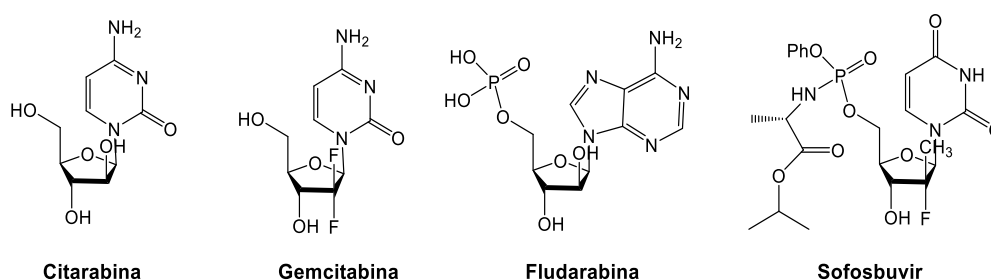


Figura 10: Exemplo de análogos de nucleósidos e nucleótidos utilizados atualmente na quimioterapia (anticancerígena e antiviral): citarabina³⁶, gemcitabina³⁷, fludarabina³⁸ e sofosbuvir³⁹.

A gemcitabina, por sua vez, é usado para tratar vários tipos de cancro, incluindo o cancro da mama, ovário, pulmão, pâncreas e bexiga. O respetivo metabolito trifosfatado também é incorporado no DNA e também necessita de transportadores de nucleósidos para entrar dentro das células. O sofosbuvir, é um composto antiviral, utilizado em casos de hepatite C crónica, inibindo a polimerase NS5B do vírus da hepatite C, uma enzima essencial para a replicação do vírus. Pode ser incorporado também no RNA do vírus da Hepatite C, interrompendo a replicação do RNA e inibindo a replicação do vírus.

Para além dos dados apresentados anteriormente, os análogos de nucleósidos têm a capacidade de interferir com processos cruciais para as bactérias como o metabolismo de nucleósidos e a biossíntese da parede celular, de ácidos nucleicos e de proteínas⁴⁰. Numerosos nucleótidos naturais e análogos sinteticamente modificados foram descritos como tendo uma atividade antibiótica moderada a boa contra diferentes estirpes bacterianas e fúngicas. Mostraram, por exemplo, ser inibidores da síntese da parede celular de bactérias⁴¹, nomeadamente da biossíntese do peptidoglicano, inibidores da divisão celular bacteriana, através da interferência na polimerização de FtsZ⁴², uma proteína do citoesqueleto das bactérias, crucial para a divisão celular e também, inibidores da quitina sintase, sendo a quitina⁴³ o principal componente da parede celular dos fungos. Deste modo, poderão ser uma solução para combater o aumento de infeções causados por microorganismos resistentes.

Também já foi demonstrado o potencial de análogos de nucleósidos e nucleótidos de inibirem a acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE)^{44,45}. Visto que, na doença de Alzheimer, a perda da neurotransmissão colinérgica é acompanhada pela redução da acetilcolina (ACh) e como estas enzimas catalisam a sua hidrólise, inibi-las é uma forma de retardar a progressão da doença. Deste modo, esta classe de compostos, para além dos inúmeros potenciais terapêuticos aqui discutidos, também tem potencial terapêutico relativamente aos doentes com demência.

1.2.2. Mecanismo de ação dos análogos de nucleósidos e nucleótidos

Estas moléculas exercem o seu efeito terapêutico após serem convertidas *in vivo* nos respetivos mono, di e trifosfatos. Os nucleósidos podem ser transportados de forma passiva, através de transportadores de nucleósidos específicos que permitem uma passagem bidirecional de acordo com a concentração do meio extracelular e intracelular (ENTs) ou podem entrar nas células através de transportadores ativos, que promovem o influxo de nucleósidos contra o gradiente de concentração (CNTs)⁴⁶.

Uma vez dentro da célula, o nucleósido ou análogo de nucleósido passa por uma fosforilação pela nucleósido cinase que vai dar origem ao respetivo nucleósido monofosfato (**figura 11**). A segunda fosforilação é feita pela nucleósido monofosfato cinase, levando ao respetivo nucleósido difosfato e por fim, a nucleósido difosfato cinase é responsável pela terceira fosforilação, dando origem ao nucleósido trifosfato, podendo este último ser incorporado no DNA ou inibir enzimas como as polimerases. Os nucleósidos e análogos de nucleósidos também podem sofrer um processo denominado desaminação, que transforma o grupo amina das purinas e pirimidinas num carbonilo.

Na **figura 11**, encontra-se o exemplo da transformação da citosina em uracilo, efetuada pela citidina desaminase. A adenosina desaminase catalisa a passagem da adenosina e desoxyadenosina a inosina e desoxyinosina, respetivamente. Também é de notar o papel da ribonucleotido redutase (RNR), que é uma enzima que catalisa a formação de desoxirribonucleótidos a partir de ribonucleótidos, removendo o grupo hidróxido da posição 2' da ribose dos nucleósidos difosfato (e em alguns casos, também dos nucleósido trifosfato), sendo uma enzima crucial na síntese do DNA, pois regula a concentração de desoxirribonucleótidos

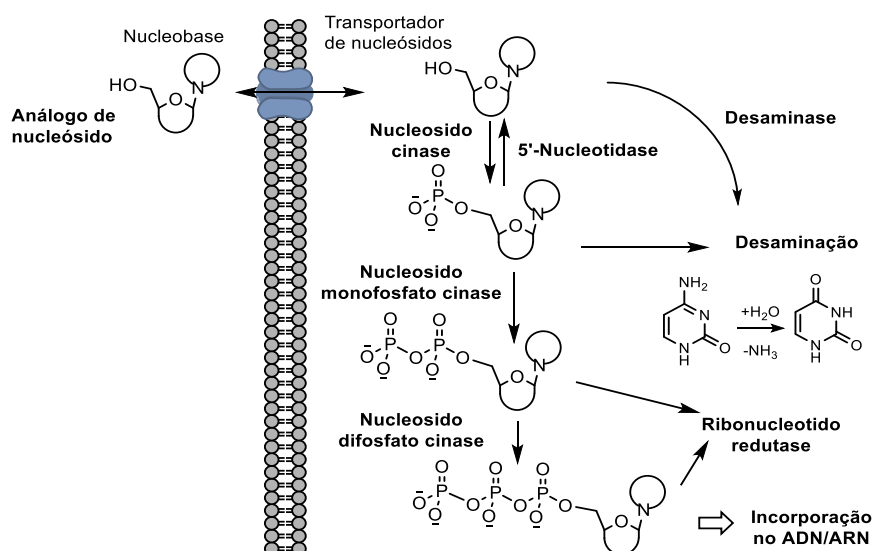


Figura 11: Mecanismo de ativação dos análogos de nucleósidos.

Um aumento na atividade da citidina desaminase está relacionada com uma diminuição da atividade *in vivo* dos análogos contendo citidina, como o citarabina e o gemcitabina⁴⁷, sendo um mecanismo de resistência adotado pelas células cancerígenas. Também se verifica uma deficiência nos transportadores de nucleósidos e até mesmo em cinases intracelulares, como as nucleosídeo cinase, como também se verifica uma diminuição da atividade da ribonucleótido redutase e 5'-nucleotidasas, que fosforilam os nucleósidos monofosfato prejudicando deste modo a formação dos metabolitos bioativos. Todos estes fatores estão associados à resistência das células cancerígenas face à dos análogos de nucleósidos, levando a uma diminuição da sua citotoxicidade.

Para ultrapassar a subexpressão de cinases nucleosídicas como mecanismo de resistência quimioterapêutica, foram desenvolvidos análogos de nucleósidos que se convertem em metabolitos fosforilados pela ação de outros tipos de enzimas, removendo assim a dependência da fosforilação por parte das cinases, que é o passo limitante da conversão de nucleósidos ao correspondente trifosfato.

Porém, a introdução de grupos fosfato (mono, di, trifosfato) nesses compostos tornou-os mais polares, resultando numa diminuição no transporte para as células. Sobretudo porque, a pH fisiológico, os grupos fosfato encontram-se carregados, como mostra a **figura 12**. Deste modo, uma possível estratégia que possa ultrapassar este problema, consiste na introdução de grupos mascaradores que também diminuem a polaridade da molécula. Nesta figura, como é possível verificar, também foram considerados análogos do grupo fosfato como os fosforamidatos e fosfonatos.

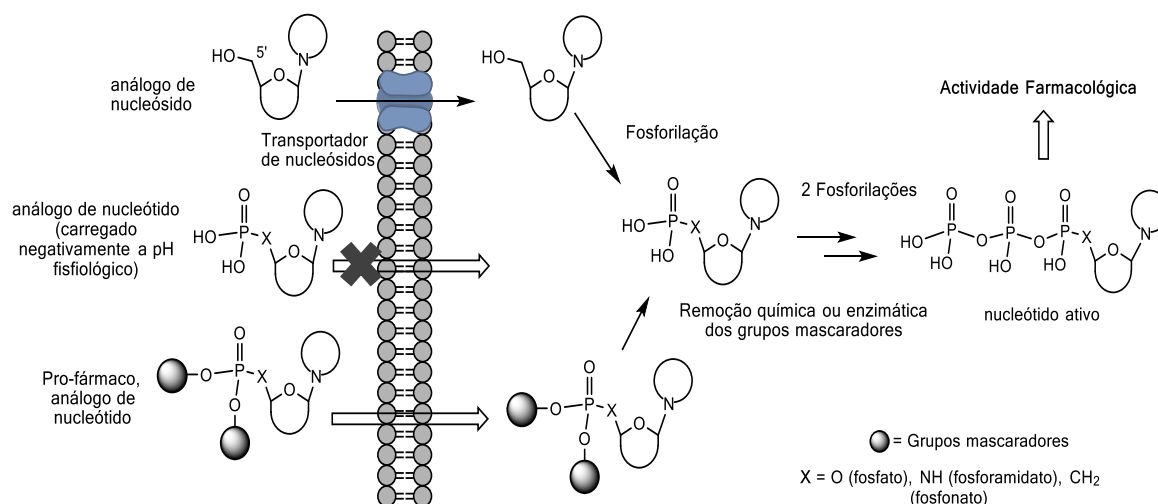


Figura 12: Representação geral da entrada nas células de nucleósidos e de nucleósidos monofosfato (ou monofosfonatos e monofosforamidados), sendo que os primeiros necessitam de transportadores de nucleósidos e que os segundos não conseguem passar pela membrana, devido à carga negativa do grupo fosfato. Quando se introduzem grupos mascaradores, os compostos atravessam a membrana celular mais facilmente e, dentro da célula, existe a remoção química ou enzimática desses grupos mascaradores, sendo posteriormente fosforilados para dar origem ao composto ativo.

1.2.3. Análogos contendo o grupo fosfonato

Os nucleósidos contendo um grupo fosfonato, através de uma ligação C-P, são quimicamente e enzimaticamente mais estáveis, comparativamente aos análogos contendo um grupo fosfato, devido ao facto de resistirem à hidrólise por parte das nucleotidases. São, deste modo, miméticos do grupo fosfato, sendo também reconhecidos e fosforilados pelas nucleótido cinases, dando origem aos di e trifosfatos correspondentes, que podem ser incorporados no DNA ou inibir enzimas responsáveis pela reparação ou síntese dos ácidos nucleicos⁴⁸.

Existem vários medicamentos no mercado contendo grupos fosfonatos, como os apresentados na **figura 13**, utilizados como antivirais.

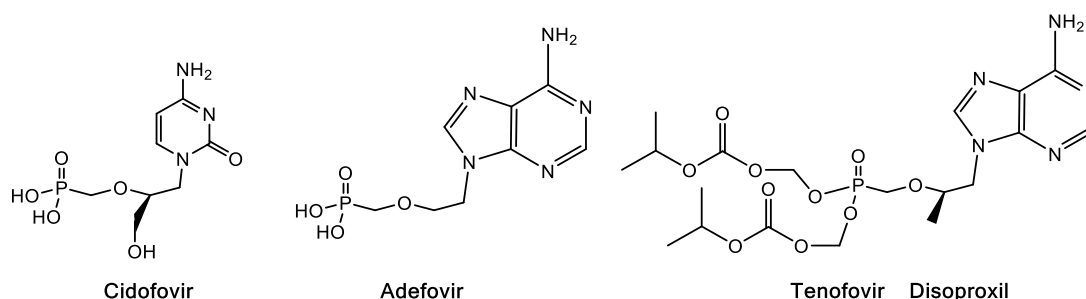


Figura 13: Exemplo de compostos utilizados como antivirais atualmente contendo grupos fosfonato: cidofovir⁴⁹, adefovir⁵⁰ e tenofovir disoproxil⁵¹.

O cidofovir (nome comercial Vistide) é um medicamento antiviral injetável utilizado principalmente como tratamento para a retinite provocada pelo citomegalovírus (CMV) em pessoas com HIV. O difosfato de cidofovir, inibe a replicação viral inibindo seletivamente as polimerases do DNA viral, conseguindo também incorporar-se no DNA viral, bloqueando a elongação da cadeia polinucleotídica durante a replicação do DNA. Atualmente existem prodrogas do cidofovir, como o brincidofovir (CMX001), que se encontra em fase experimental. Conjugado a um lípido, o cidofovir é libertado intracelularmente, permitindo concentrações plasmáticas intracelulares mais altas, aumentando efetivamente a sua atividade contra os vírus dsDNA (vírus de DNA de cadeia dupla), bem como a biodisponibilidade oral⁵². O adefovir é um medicamento usado para tratar infeções com o vírus da hepatite B. É um inibidor da transcriptase reversa, uma enzima crucial para a reprodução do VHB no corpo. Pode ser formulado como o pró-fármaco pivoxil adefovir dipivoxil, pelo mesmo motivo presente no caso do cidofovir. O tenofovir disoproxil, por sua vez, é utilizado no tratamento da hepatite B crónica e como prevenção e tratamento do HIV, geralmente é utilizado em conjunto com outros antirretrovirais.

Todos estes compostos demonstram que a substituição de um grupo fosfato por um grupo fosfonato é uma solução viável, dando origem a excelentes resultados e a uma maior resistência. Para além disso, estes compostos são acíclicos, isto é, não têm um anel monossacarídico, mas sim uma estrutura linear que acaba por mimetizar uma furanose, demonstrando que análogos de nucleótidos e nucleótidos contendo fragmentos ou unidades miméticas, também são reconhecidos pela maioria das enzimas.

1.2.4. Análogos contendo o grupo fosforamidato

Dentro dos análogos de nucleósidos que têm demonstrado ter atividade biológica associada a boas propriedades farmacocinéticas para aplicação clínica, destacam-se os fosforamidatos. Estes análogos de nucleótidos em que um grupo amina substitui um grupo alcóxilo ou hidroxilo, são moléculas neutras e moderadamente lipofílicas que mostram uma boa permeabilidade celular. Este aspeto torna o seu uso vantajoso relativamente aos análogos de nucleósidos e nucleótidos monofosfato, visto que a maioria não consegue penetrar as células devido ao seu carácter hidrofílico, como já foi referido.

O melhor representante destes análogos devido à sua atividade antiviral é o Sofosbuvir, sendo um dos mais poderosos agentes contra a hepatite C, como já foi referido anteriormente. Outro caso bastante ilustrativo do potencial destes análogos é o citarabina fosforamidato, que mostrou maior citotoxicidade que a citarabina contra linhas celulares de leucemia com particular défice de cinases de nucleótidos e transportadores de nucleótidos⁵³.

Outro tipo de nucleósidos fosforamidato, que foram recentemente reportados pelo nosso grupo⁵⁴, contêm a função fosforamidato ligada pelo átomo de azoto a C-5' da unidade nucleosídica. O racional presente no desenvolvimento destas moléculas é baseado na sua possível conversão intracelular em 5'-amino nucleósidos 5'-N-trifosfato através das fosforilações sucessivas por cinases (**figura 14**) e posterior incorporação nos ácidos nucleicos, resultando numa eventual paragem do alongamento da cadeia de DNA ou RNA.⁵⁵

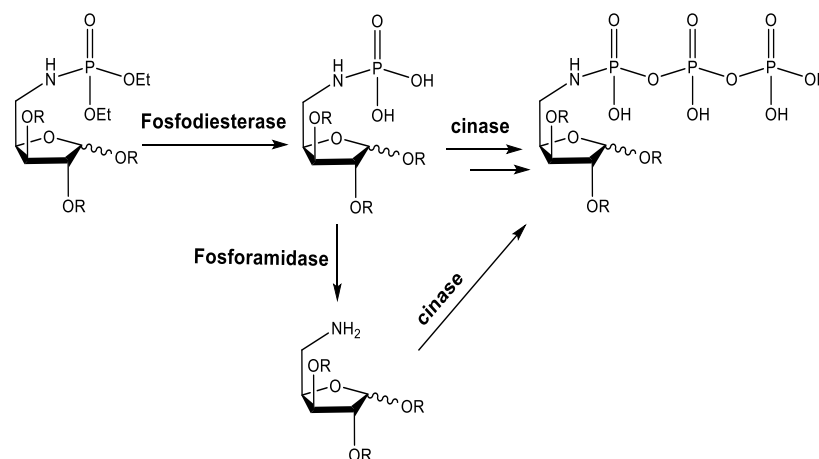


Figura 14: Representação da ação das fosfodiesterases, fosforamidases e cinases nos análogos de nucleótidos contendo o grupo fosforamidato.

Os diésteres de fosforamidatos de alquila, uma vez dentro da célula, são suscetíveis a fosfodiesterases⁵⁶ (**figura 14**), um passo que normalmente ocorre durante a ativação intracelular de pronucleotídeos do tipo éster. Por outro lado, os fosforamidatos desprotegidos resultantes podem também sofrerem clivagem por fosforamidases celulares, um processo que pode ocorrer em competição com a fosforilação mediada por cinase, conduzindo aos correspondentes 5-amino nucleósidos. Estes metabolitos podem ser então consecutivamente fosforilados, até obter os respetivos análogos de nucleósidos trifosfato, como demonstra a figura.

A capacidade de a DNA polimerase I de incorporar nucleósidos deste tipo no DNA através da formação de ligações internucleotídicas do tipo fosforamidato, já foi demonstrada⁵⁷ e, deste modo, estes miméticos de nucleósidos trifosfato demonstram ser suficientemente estáveis para a sua incorporação na cadeia polinucleotídica.

1.3. Compostos alvo

Como já foi referido, os compostos explorados neste trabalho são análogos de nucleósidos e nucleótidos, tendo como estruturas gerais as apresentadas na **figura 15**.

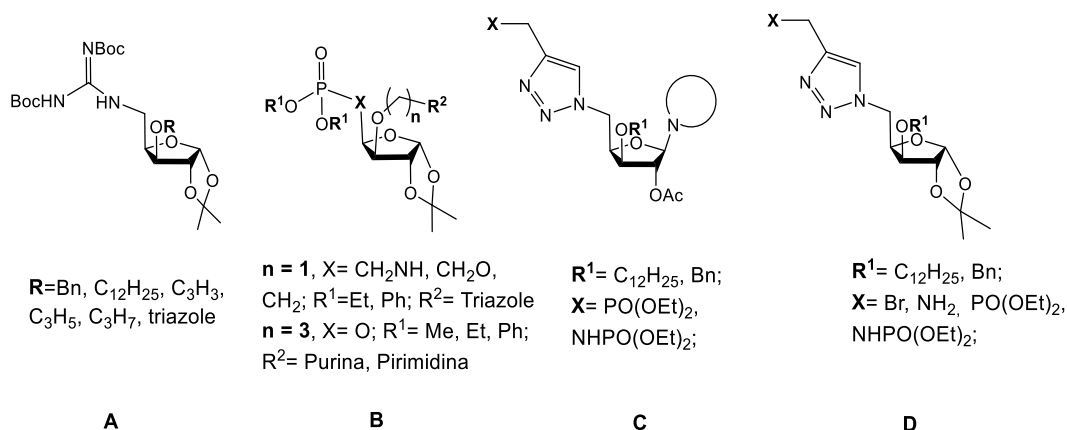


Figura 15: Estruturas gerais dos compostos alvo.

Relativamente aos guanidino açúcares (**A**), o racional da introdução do grupo guanidina tem em conta a possibilidade de este sistema funcionar como mimético de uma base azotada. Esta hipótese advém do facto de a funcionalidade guanidina estar presente no anel pirimidínico do biciclo guanina (**figura 16**). Por outro lado, o sistema amidina ($\text{NH}_2\text{-C=NR}$, ou imidamida) da unidade guanidina também está presente na citosina e adenina. No que se refere a potenciais inibidores de cinases, a inserção deste grupo também é promissora, pois algumas interações-chave com o sítio ativo das cinases semelhantes às estabelecidas pela unidade adenina do ATP (**figura 17**)⁵⁸ poderão ser estabelecidas, nomeadamente a partir do grupo amina e do átomo de azoto imínico.

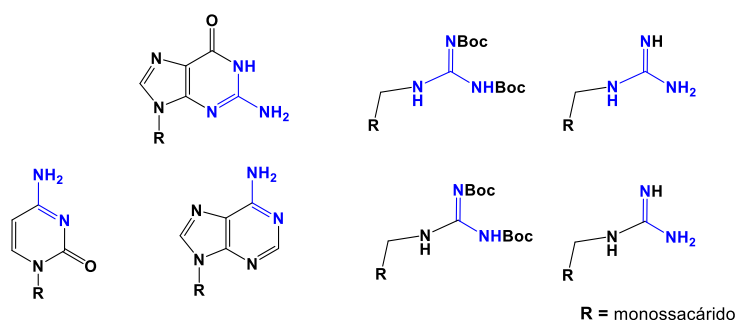


Figura 16: Guanidino açúcares como potenciais miméticos de nucleósidos.

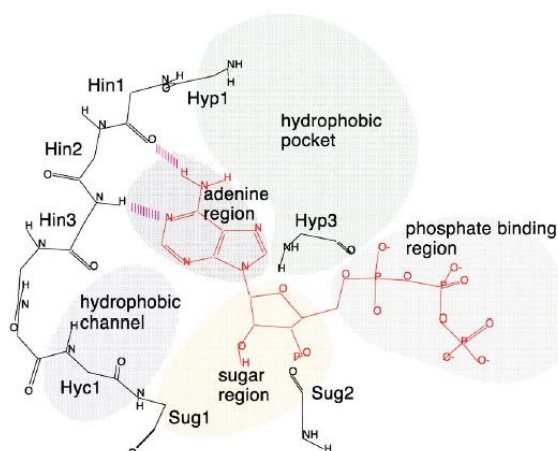


Figura 17: Representação esquemática do modo de ligação do ATP a uma cinase, com as diferentes regiões de interação⁵⁸. Duas interações-chave são estabelecidas a partir do N-1 e do grupo amina da adenina (ligações de hidrogénio).

Também são explorados isonucleótidos, sendo assim chamados por terem a base azotada ou um sistema mimético desta numa posição diferente da posição 1 do açúcar e contendo um grupo fosfato ou um grupo mimético do grupo fosfato di-*O*-substituído com grupos apolares (**B**). Pretendeu-se colocar a base azotada ou um heterociclo N-heteroaromático análogo, nomeadamente uma unidade de triazole, numa *O*-ramificação da posição 3. Por último, também se explorou a síntese de possíveis análogos de nucleótidos contendo um sistema mimético de um grupo difosfato (quando $X = \text{PO}(\text{OEt})_3$), visto que o triazole é considerado um isóstero neutro e estável do grupo fosfato^{59,60}, e contendo uma base azotada na posição anomérica (**C**). Moléculas mais simples, precursoras dos compostos do tipo C (**D**), que não contêm a base azotada, podem ser consideradas análogos de açúcares difosfato ou de isonucleósidos, quando $X = \text{NH}_2$, ou seja contendo um sistema (aminometil)triazole. A introdução de grupos apolares como o dodecilo também teve em conta a diminuição da polaridade destes compostos o que poderá promover a penetração nas células.

1.3.1. Plano de Síntese

Para obter os compostos alvo, foram utilizadas várias abordagens sintéticas. Primeiro, partindo de 1,2:5,6-di-*O*-isopropilideno- α -D-glucofuranose (nome trivial: diacetónido de D-glucose, doravante designado como DAG), foram obtidos os compostos assinalados a azul, contendo o grupo hidroxilo e o grupo azida na posição 5 (**figura 18**). Partindo dos precursores contendo o grupo hidroxilo na posição 5, explorou-se a introdução dos grupos fosfonato e fosfato e a conversão do grupo propargilo ($R = \text{C}_3\text{H}_3$) num ciclo de triazole, através de reação de cicloadição 1,3-dipolar de tipo “Click-chemistry”. Para a síntese de isonucleótidos contendo um espaçador propilo, partiu-se do precursor contendo o grupo alilo e, de forma a utilizar a reação de Mitsunobu para introduzir uma base azotada é necessária a introdução de um grupo hidroxilo terminal, tendo para isso sido explorados procedimentos de hidroboração-oxidação.

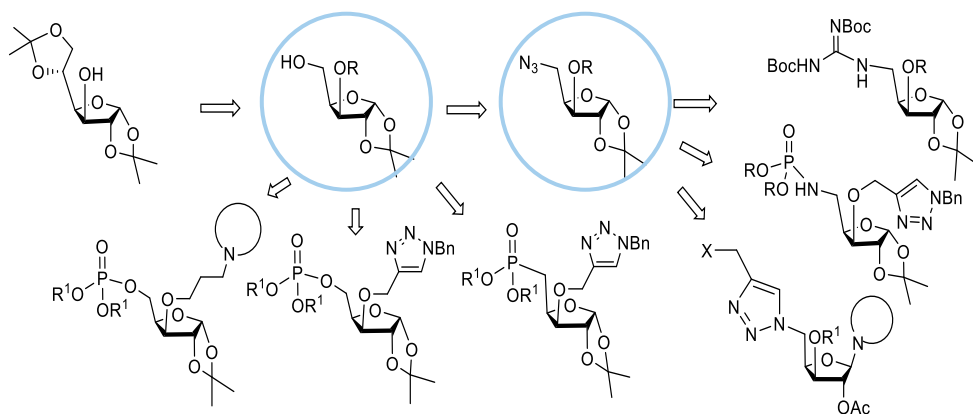


Figura 18: Plano geral de síntese.

Para obter os guanidino açúcares, partiu-se dos precursores contendo o grupo azida e diferentes grupos R, tendo sido explorados dois procedimentos para a guanidinilação. Para introduzir os grupo fosoramidato na posição 5, partindo dos precursores contendo azida, recorreu-se à reação Staudinger-fosfito. Também se obtiveram derivados contendo uma unidade de triazole na posição 5 explorando a reação de cicloadição térmica e para X = Br foi explorada a reação de Arbuzov de forma a introduzir um grupo fosfonato. Por fim, para introduzir a base azotada na posição anomérica recorreu-se à *N*-glicosilação.

1.3.2. Guanidinilação

O procedimento utilizado para introdução do grupo guanidina a partir dos precursores contendo o grupo azida foi feito segundo o descrito na bibliografia⁶¹, sendo necessário para esta reação a utilização de uma guanidina estrategicamente protegida, *N',N''*-di-*tert*-butoxicarbonil-*N*-trifluorometanosulfonyl guanidina (*N',N''*-diBoc-*N*-Tf-guanidina, GN-Tf), representada na **figura 19**.

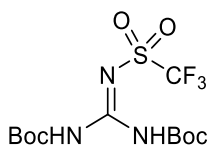
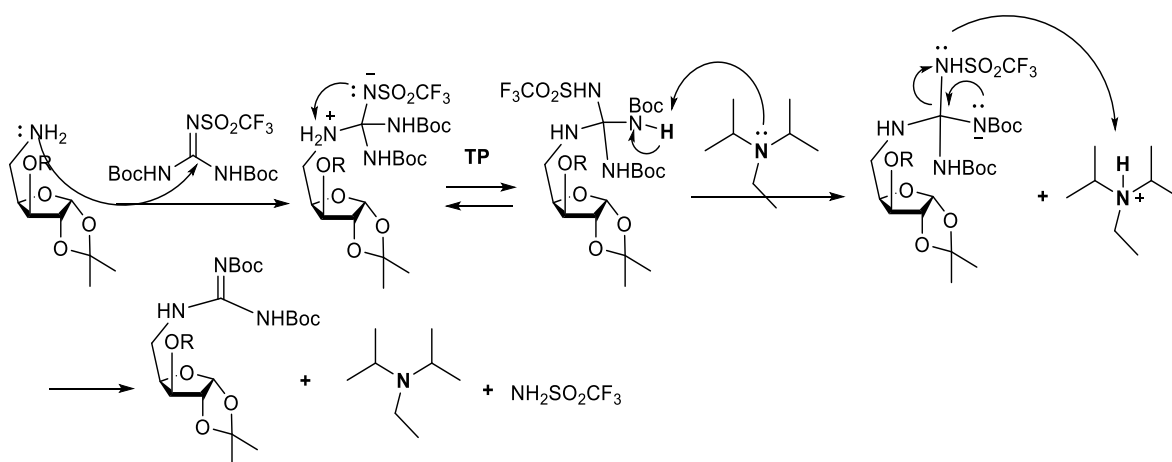


Figura 19: Reagente chave no passo de guanidinilação. *N',N''*-diBoc-*N*-Tf-guanidina ou **GN-Tf**

O mecanismo encontra-se descrito no **esquema 1**.

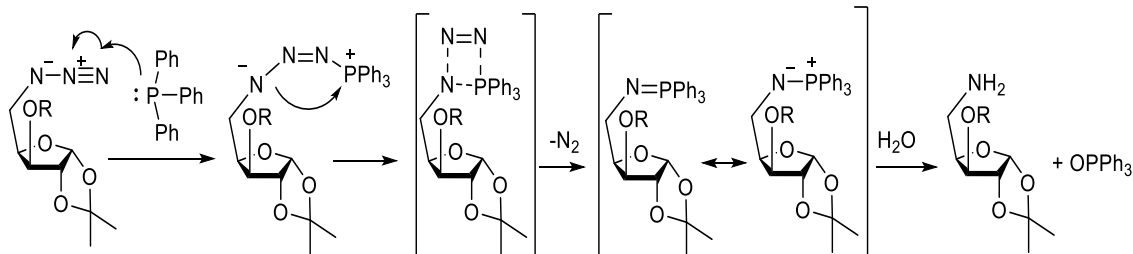


Esquema 1: Mecanismo da reação de guanidinilação utilizando o processo descrito na bibliografia

1.3.3. Reação de Staudinger

Como é possível ver no **esquema 1**, de forma a obter a guanidina desejada, primeiro é necessário reduzir-se a azida a amina, que é posteriormente desprotonada de modo a obter um bom nucleófilo e que vai atacar a GN-Tf.

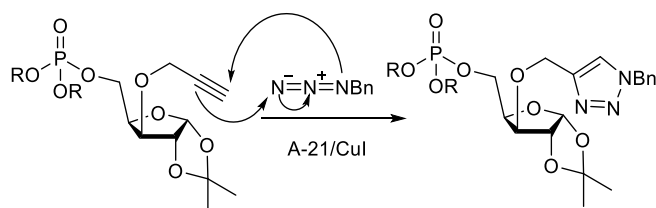
Um dos problemas presentes com o protocolo descrito por A. Santana *et al*⁶¹ mencionado anteriormente, é o facto de, como são utilizadas condições de hidrogenação catalítica, os grupos *O*-alilo e *O*-propargilo contidos em dois dos derivados 5'-azido furanosídicos precursores são reduzidos a grupos propilo. No entanto, essas condições de hidrogenação catalítica não levaram à redução do grupo *O*-benzilo. Tornou-se, portanto, essencial um método alternativo de redução do grupo azida a amina, sem reduzir os grupos *O*-alilo ou *O*-propargilo. A reação de Staudinger é uma ótima e simples alternativa para converter o grupo azida em amina, visto que os rendimentos são praticamente quantitativos e não afeta os substituintes presentes no açúcar. O **esquema 2** representa o mecanismo na redução de Staudinger, que usa trifenilfosfina e água. A adição nucleofílica de trifenilfosfina ao átomo de azoto terminal do grupo azida leva à formação de um intermediário iminofosforano que é hidrolizado à amina, formando-se óxido de trifenilfosfina como produto lateral.



Esquema 2: Mecanismo presente na reação de Staudinger

1.3.4. Click-chemistry

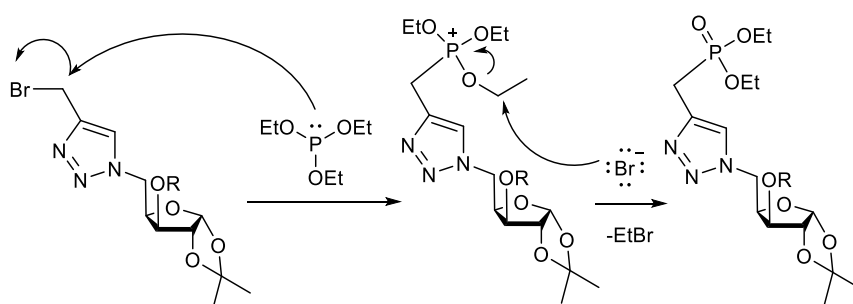
De forma a sintetizar os isonucleótidos contendo o grupo triazole como mimético das bases azotadas, recorreu-se à reação de ciclo adição azida-alcino catalizada por cobre(I)⁶². Deste modo obtém-se apenas o regioisómero 1,4-dissubstituído, evitando a formação de derivados de triazole 1,5-dissubstituídos.



Esquema 3: Mecanismo da reação de *Click-chemistry*, utilizando azida de benzilo e A-21/CuI.

1.3.5. Reação de Arbuzov

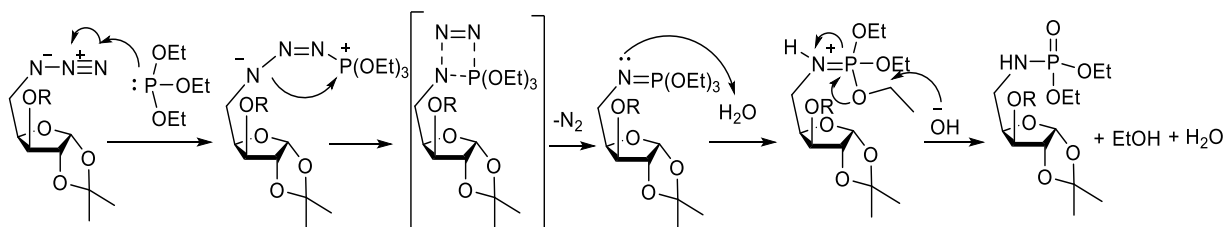
De forma a converter os derivados furanosídicos contendo o sistema (bromometil)triazole nos correspondentes derivados (triazolil)metil fosfonato, utilizou-se a reação de Arbuzov, estando o mecanismo representado no **esquema 4**.



Esquema 4: Mecanismo da reação de Arbuzov

1.3.6. Reação de Staudinger-fosfito

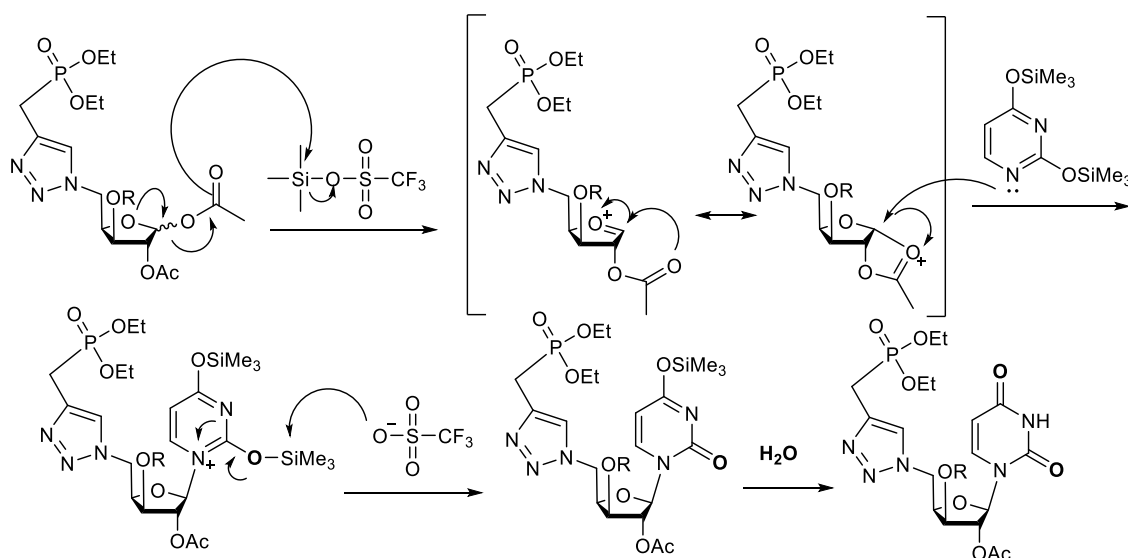
A reação Staudinger-fosfito é uma variante da reação de Staudinger que permite a conversão de um grupo azida a dialquil fosforamidato, utilizando um trialquil fosfito. O mecanismo apresentado no **esquema 5** inclui trietil fosfito. Este composto acaba por atuar de forma semelhante à da trifenilfosfina na reação de Staudinger.



Esquema 5: Mecanismo da reação Staudinger-Fosfito

1.3.7. *N*-Glicosilação de nucleobases sililadas

De forma a introduzir uma base azotada na posição anomérica do anel xilofuranosídico, foi utilizada esta reação em que o dador de glicosilo é o açúcar 1,2-O-acetilado e o aceitador consiste na base azotada sililada de forma a torná-la mais nucleofílica (devido às propriedades de eletrodoação do silício) e mais solúvel em solventes orgânicos. Usa-se um ácido de Lewis, neste caso o triflato de trimetilsililo (TMSOTf) para facilitar a saída do grupo acetato anomérico (**esquema 6**).



Esquema 6: Mecanismo da *N*-glicosilação – Acoplamento de uma nucleobase sililada a um acetato de glicosilo usando TMSOTf como ácido de Lewis.

1.4. *Docking* Molecular

O *docking* molecular é um método, no âmbito da modelação molecular, que tenta prever a orientação preferencial de uma determinada molécula quando ligada a um alvo biológico, sendo que este último, poderá ser uma outra molécula simples, uma proteína, uma enzima, um ácido nucleico, etc. Para além da orientação (geometria), os resultados obtidos permitem prever a afinidade de ligação entre essas moléculas. É um dos métodos mais frequentemente utilizados no design de fármacos, através da simulação prévia da ligação da molécula a um alvo/recetor e assim desenhá-la tendo em conta o local de ligação (*binding site*) desse alvo terapêutico. De forma resumida, o *docking* consiste numa simulação computacional que permite prever o modo de ligação entre um ligando e um recetor onde são testadas várias poses (modos de ligação) e feitas várias avaliações de energia (*scorings*). Assim, é possível obter um ordenamento (*ranking*) dos

ligandos verificando quais os mais favoráveis baseando-se no resultado do *score* aplicado, dando o respetivo valor de energia de ligação⁶³.

Como foi referido, o *score* avalia a energia de uma determinada pose, sendo muito comum usar função de *score* que tem em conta as interações Van der Waals, as ligações de hidrogénio, a solvatação e interações hidrofóbicas e por último, as respetivas torsões, que pode ser representado pela seguinte função: $\Delta G_{\text{ligação}} = \Delta G_{\text{vdW}} + \Delta G_{\text{elec}} + \Delta G_{\text{hbond}} + \Delta G_{\text{desolv}} + \Delta G_{\text{tors}}$

Deste modo, é possível fazer um *screening* virtual de uma ou mais famílias de compostos, otimizar determinadas moléculas/fármacos (perceber através da simulação se determinados grupos funcionais melhoram ou pioram a afinidade com o alvo terapêutico, por exemplo) e efetuar o *design de novo* de gerações de compostos. As vantagens deste método são os custos reduzidos, o facto de ser possível testar um elevado número de moléculas e também testar moléculas que ainda não foram sintetizadas.

De forma a simular as interações entre as duas moléculas, por exemplo um ligando e o alvo terapêutico, é preciso ter em conta de que estas moléculas são flexíveis, mas do ponto de vista prático não é possível contabilizar todas as conformações e graus de liberdade na simulação. Desta forma, o *docking* pode ser feito usando três estratégias possíveis: considerar o ligando rígido e o alvo rígido – *Docking* rígido; considerar o ligando flexível e o alvo rígido – *Docking* flexível; considerar o ligando e o alvo flexíveis – *Docking* de ajuste induzido. Em termos práticos, a estratégia mais comum é usar *docking* flexível e a flexibilidade dos ligandos tem apenas em conta os ângulos diedros (torsões).

Como o alvo terapêutico, na maior parte dos casos, é uma macromolécula ou uma molécula muito mais complexa do que o ligando, para além da sua conformação, é preciso ter em conta a zona de ligação. Na maioria dos casos, a sua estrutura é conhecida (através de raios-X ou RMN) e encontra-se disponível na Protein Data Base o respetivo PDB, ou seja, um ficheiro com essa informação. Desta forma, o *docking* pode ser local, ou seja, o local de ligação é conhecido e, portanto, restringe-se àquela zona em específico da enzima, proteína, etc. Caso contrário, quando essa informação não é conhecida, é preciso ser efetuado um *docking* geral, o que é muito demorado, tendo em conta que é necessário analisar inúmeras poses.

No âmbito deste trabalho, utilizou-se o alvo rígido e o ligando flexível pois foram testados inúmeros compostos e não seria exequível fazer outro tipo de *docking* molecular. O software utilizado para os estudos de *docking* foi o AutoDock Vina, sendo de notar que este software utiliza uma função *score* diferente da referida anteriormente, ou seja, possui uma função específica que contabiliza interações intermoleculares com pesos específicos na função, entre outras características⁶⁴.

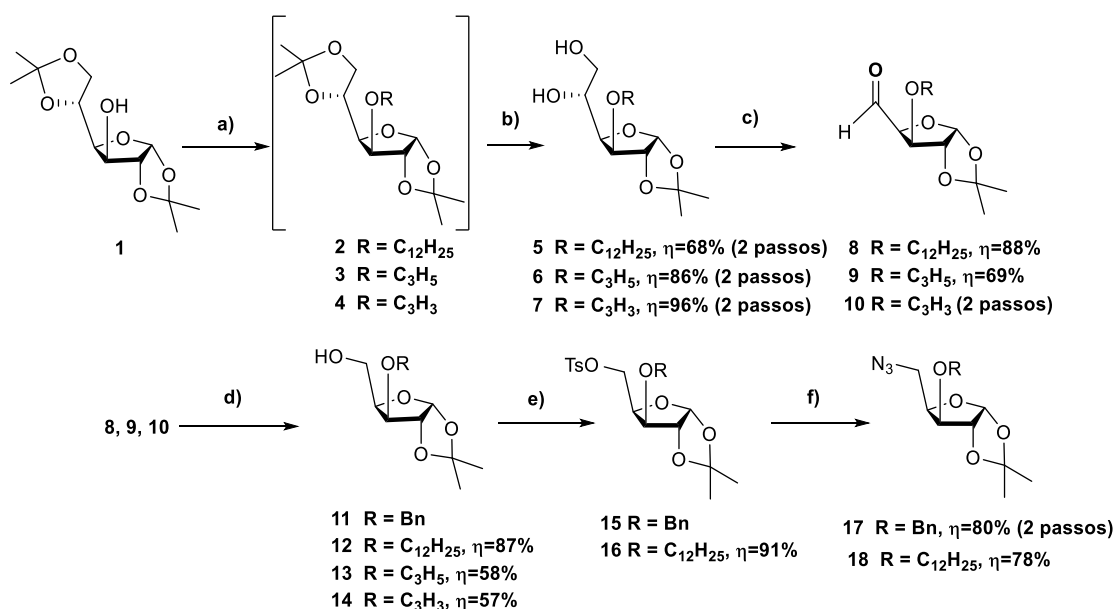
Capítulo 2

Apresentação e Discussão de resultados

2. Apresentação e Discussão de resultados

2.1. Síntese de 5-azido-xilofuranoses

A síntese destes precursores, com diferentes *O*-substituintes na posição 3 do açúcar, encontra-se representada no **esquema 7**. De um modo geral, a estratégia sintética consistiu em substituir seletivamente a posição 3 do açúcar partindo do DAG, seguida de remoção seletiva do grupo isopropilideno das posições 5 e 6, de clivagem oxidativa, de forma a obter os derivados 5-formilo de 1,2-*O*-isopropilideno-D-*xilo*-furanoses 3-*O*-substituídas e posterior redução do aldeído de forma a obter o álcool correspondente. Por último, foi introduzido um grupo tosilo para que a seguir fosse possível colocar um grupo azida, dando origem aos compostos desejados.



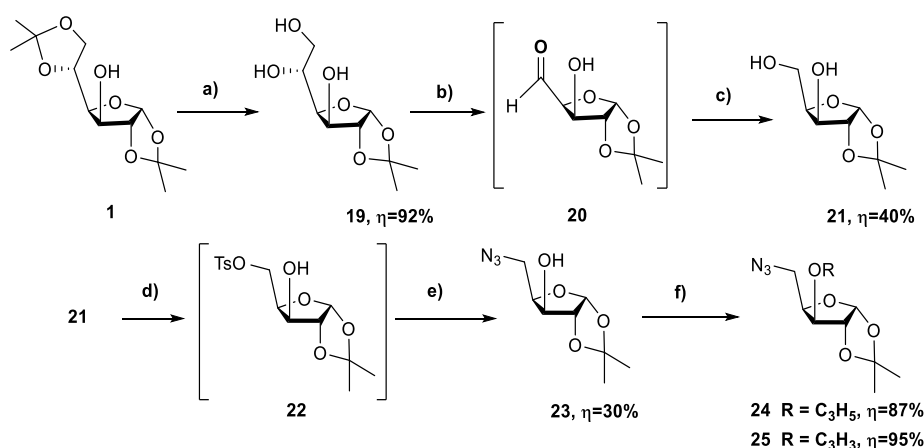
Esquema 7: Síntese das 5-azido-xilofuranoses **17** e **18**. Reagentes e condições: **a)** 1.2eq NaH, 1.2eq RBr, DMF; **b)** AcOH 76% aq.; **c)** 1.5eq NaIO₄, THF/H₂O (3:1); **d)** 1.5eq NaBH₄, EtOH/H₂O (2:1); **e)** 2eq TsCl, py; **f)** 3eq NaN₃, DMF, 80°C.

Os compostos **17** e **18**, foram obtidos com sucesso, porém, os restantes azido açúcares precursores desejados contendo grupos *O*-alilo e *O*-propargilo, não foram obtidos por esta via sintética. Apesar de os compostos **13** e **14** reagirem e formarem os respetivos derivados tosilados, estes eram extremamente instáveis sobretudo quando submetidos às condições de azidação, onde se verificava a conversão destes compostos nos respetivos álcoois, ou seja, voltavam-se a obter os produtos **13** e **14**.

Para a obtenção do azido açúcar precursor contendo o grupo benzilo na posição 3 (**17**) partiu-se do composto **11**, previamente sintetizado no laboratório. Também é de notar que, apesar da hidrólise do grupo isopropilideno ser uma reação com rendimentos elevados, no caso do composto

5, existiu uma conversão menor e mais lenta, o que se reflete no facto do rendimento ser mais baixo comparativamente com os restantes compostos. Tentou aquecer-se a mistura reacional a 40°C, o que possivelmente iria diminuir o tempo reacional, mas não só não existiu uma conversão mais rápida, como também se verificou por TLC o aparecimento de outra mancha no ponto de aplicação. Provavelmente, o aquecimento nesta situação promoveu a formação de produtos de degradação, nomeadamente o produto de hidrólise do grupo 1,2-*O*-isopropilideno. Também se verificou que os compostos **9**, **10**, **13** e **14** tinham alguma afinidade com a água o que fez com que o tratamento das respetivas reações diminuísse consideravelmente os rendimentos obtidos, pois por TLC verificava-se sempre que parte dos compostos ficava na fase aquosa.

De forma a obter as 5-azido xilofuranoses contendo os grupos *O*-alilo e *O*-propargilo em C-3 e, uma vez que não se conseguia introduzir o grupo azida utilizando o procedimento anterior, optou-se por obter primeiro a azida a partir do derivado de xilofuranose contendo a posição 3 livre (**23**) e substituir posteriormente esta posição com os grupos desejados, como se encontra representado no **esquema 8**.

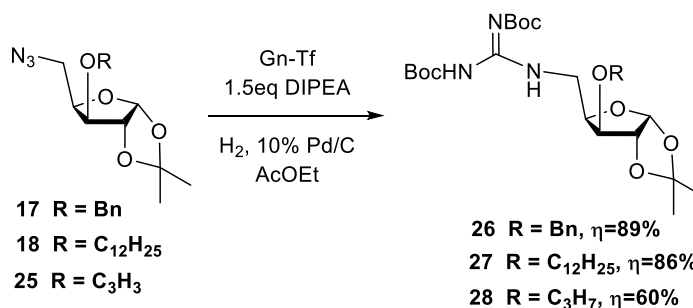


Esquema 8: Síntese das 5-azido xilofuranoses **24** e **25**. Reagentes e condições: **a)** AcOH 60% aq.; **b)** 1,5eq NaIO₄, THF/H₂O (3:1); **c)** 1,5eq NaBH₄, EtOH/H₂O (2:1); **d)** 2eq TsCl, py; **e)** 3eq NaN₃, DMF, 80°C; **f)** 1.2eq NaH, 1.2eq RBr, DMF;

No entanto, os precursores obtidos, sobretudo os compostos **20** e **21**, são compostos tão polares que têm mais afinidade para a água do que para solventes orgânicos como o AcOEt, o que compromete o tratamento da mistura reacional, isto é, não é possível efetuar extrações e remover facilmente o borohidreto de sódio e o periodato de sódio. Como alternativa à extração líquido-líquido, utilizou-se filtração sob celite e coluna cromatográfica. Deste modo, foi possível obter a azida desejada (**23**), tendo sido introduzidos os grupos alilo e propargilo com sucesso, dando origem aos compostos desejados (**24** e **25**).

2.2. Síntese de guanidino açúcares

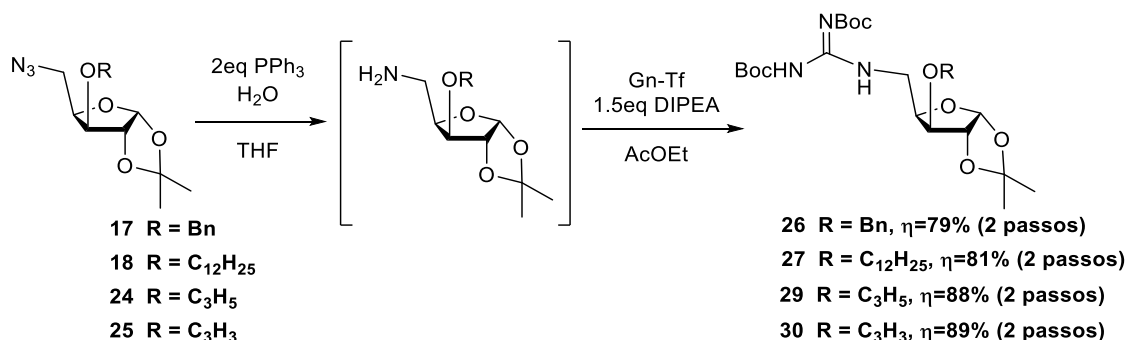
Utilizou-se o procedimento descrito por A. Santana *et al*⁶¹, de modo a introduzir o grupo guanidina, partindo das 5-azido xilofuranoses (**esquema 9**). Os compostos **26** e **27** foram obtidos com sucesso, verificando-se conversão total dos respectivos precursores. Os guanidino açúcares foram caracterizados por ¹H-RMN (Anexo **A1.19** e **A1.20**, respetivamente), verificando-se o aparecimento dos grupos metilo dos dois grupos *terc*-butoxicarbonilo (Boc) da guanidina a um valor de desvio químico de cerca de 1,50 ppm. O composto também foi analisado por ¹³C-RMN, sendo que o carbono quaternário da função guanidina aparece aos 163 ppm e também é possível verificar o aparecimento de dois picos correspondentes aos dois carbonos carbonílicos dos grupos Boc por volta dos 156 ppm e 152 ppm.



Esquema 9: Síntese dos guanidino açúcares **26**, **27** e **28**.

No entanto, quando se utilizou o mesmo procedimento para obter o guanidino açúcar a partir do composto **25**, verificou-se por TLC a formação de vários compostos secundários originados pela decomposição do composto à temperatura ambiente. Por ¹H-NMR, verificou-se que o grupo propargilo foi reduzido para o correspondente grupo propilo, ou seja, a ligação tripla foi reduzida com η=60%, originando o composto **28** (anexo **A1.17**).

Como o grupo propargilo é sensível às condições de hidrogenação utilizadas neste procedimento, explorou-se uma abordagem diferente. De modo a obter a amina a partir da azida, procedeu-se à reação de Staudinger, que para os compostos **24** e **25** deu origem aos produtos desejados de forma praticamente quantitativa, levando à formação das guanidinas **29** e **30** como mostra o **esquema 10**.



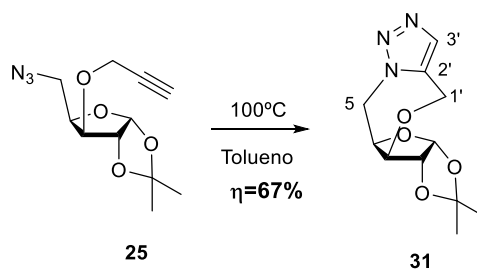
Esquema 10: Síntese dos guanidino açúcares **26**, **27**, **29** e **30** - Reação de Staudinger.

Este procedimento também foi aplicado para obter os compostos **26** e **27** e assim, foi possível concluir que, de um modo geral, os rendimentos obtidos para os dois métodos de guanidinilação foram semelhantes. Apesar desta última metodologia consistir em dois passos ao contrário da reportada na literatura, este método demonstrou ser igualmente eficiente, com a vantagem de que é compatível com a presença de outros grupos sensíveis a redução por hidrogenação.

Utilizando o composto **30**, procedeu-se à reação de cicloadição *Click-chemistry* com azida de benzilo de modo a formar o triazole desejado. Verificou-se por TLC a formação de um composto, porém, quando se fez a cromatografia em coluna de forma a purificá-lo, este ficou retido na coluna. Deste modo, uma possível alternativa seria utilizar uma coluna de fase reversa.

2.3. Formação intramolecular do ciclo triazole

Verificou-se que o composto **25** se degradava ligeiramente à temperatura ambiente, por TLC (eluente 1:1, AcEtO/éter de petróleo) e por ¹H-RMN, pela indicação de que outros compostos se formavam ao longo do tempo. Deste modo, de forma a compreender qual o produto mais estável resultante dessa degradação e tendo em conta de que a molécula contém um grupo azida e o grupo propargilo, o que poderia originar a ciclização intramolecular numa unidade de triazole, o composto foi sujeito a uma temperatura elevada, utilizando tolueno como solvente (**esquema 11**). Passadas 2h, verificou-se por TLC (1:1, AcEtO/éter de petróleo), que o composto maioritário correspondia a uma mancha presente na TLC resultante da degradação verificada quando o composto se encontrava a temperatura ambiente.



Esquema 11: Ciclização térmica intramolecular do composto **25**.

Após recristalização, foram obtidos 40mg de um pó branco que foi analisado por ^1H RMN, tendo sido confirmado a presença de um triazole 1,5-disubstituído intramolecular (**31**), devido à presença de um singleto a 7,48 ppm, correspondente ao único próton do ciclo triazole (**C-3'**). Como os sinais de carbono correspondentes ao triazole aparecem a 135 ppm (**C-2'**) e 132 ppm (**C-3'**). Como o valor de desvio químico observado para **C-3'** é característico de triazoles 1,5-dissubstituídos⁶⁵, foi possível concluir que se tratava desse regioisômero apenas. O facto de, por HMBC, não se verificar interação entre o carbono que contém o próton (neste caso, o **C-3'**) e os prótons do carbono **5**, confirma mais uma vez que se trata do regioisômero 1,5-dissubstituído. No caso do regioisômero 1,4 dissusituido, possivelmente ver-se-ia uma correlação entre o carbono que continha o próton do triazole e os prótons do carbono **5** visto que estariam a três ligações de distância.

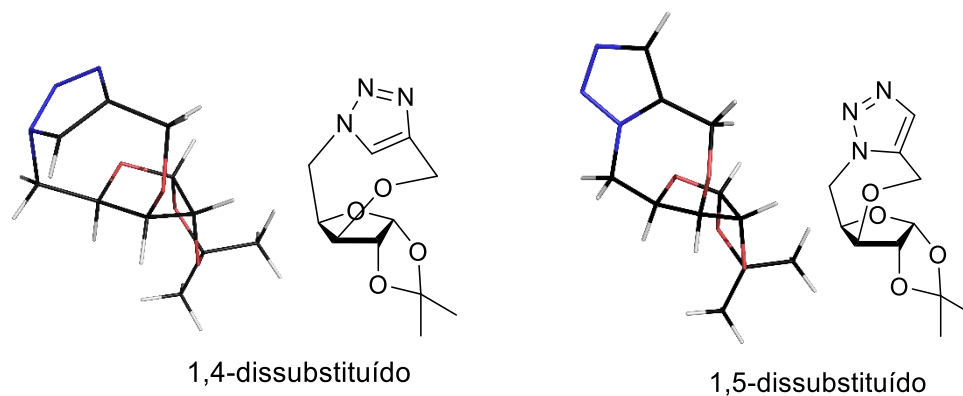


Figura 20: Representação 2D e 3D dos triazoles intramoleculares 1,4-dissubstituído e 1,5-dissubstituído.

De forma a tentar compreender o motivo pelo qual não se verificou formação, nem sequer vestigial, do regioisômero 1,4-disubstituído, foram feitos cálculos das energias das respetivas estruturas moleculares dos dois regioisômeros, utilizando um modelo quântico (PBE1PBE/6-311G**). As energias foram calculadas tomando como zero o valor do regioisômero 1,5-

dissubstituído. Os cálculos foram realizados em dois modelos contínuos de solvente – clorofórmio e tolueno – de modo a perceber se o solvente tinha alguma influência nos resultados. Os valores das diferenças de energia obtidos, encontram-se na **Tabela 1**:

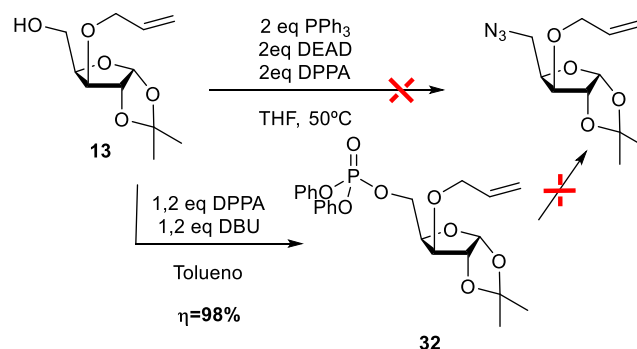
Tabela 1: Energias relativas obtidas para os diferentes regioisómeros, considerando clorofórmio ou tolueno como solvente. As energias foram calculadas tomando como zero o regioisómero 1,5 disubstituído.

| | Clorofórmio | | | Tolueno | | |
|---------------------------|--|--------------------------|--------------------------|--|--------------------------|--------------------------|
| | $\Delta E_{\text{eletrónica}}$ (kcal/mol) | ΔH (kcal/mol) | ΔG (kcal/mol) | $\Delta E_{\text{eletrónica}}$ (kcal/mol) | ΔH (kcal/mol) | ΔG (kcal/mol) |
| 1,5 di-substituído | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1,4 di-substituído | 53,9 | 53,1 | 53,8 | 54,2 | 53,2 | 53,4 |

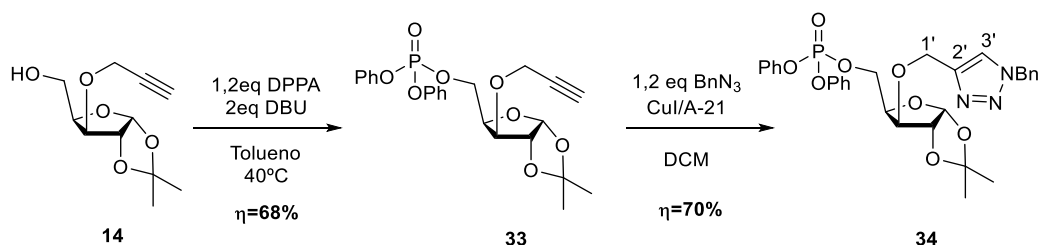
De um modo geral, é possível concluir que, as diferenças de energia obtidas em ambos os casos foram semelhantes, o que indica que à partida, o solvente não tem qualquer influência na formação dos regioisómeros. No entanto, é possível verificar que a diferença de energia dos regioisómeros é extremamente elevada (na ordem das 53kcal/mol), o que justifica o facto de não existir sequer uma formação mínima do regioisómero 1,4-disubstituído.

2.4. Síntese dos isonucleótidos

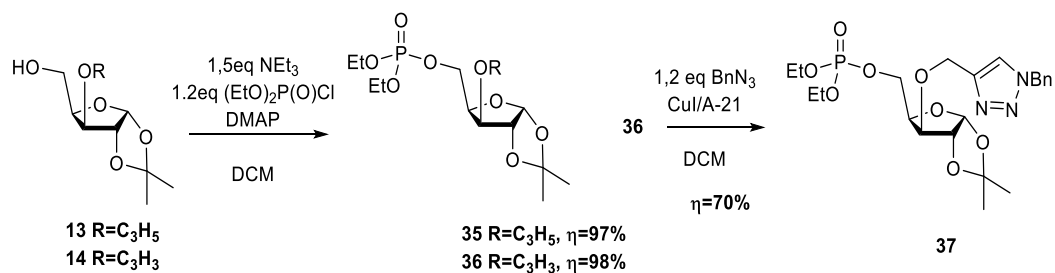
Como a partir dos compostos **13** e **14** não era possível obter a correspondente azida desejada, tentaram-se vários métodos incluindo Mitsunobu e um método encontrado na literatura⁶⁶. Pela reação de Mitsunobu, por TLC, não se verificou nenhuma formação de produtos, mesmo após aquecimento, como é possível verificar no **esquema 12**. Utilizando o segundo método, foi possível verificar por TLC a formação de um composto, passado 30 minutos, tendo sido esse composto analisado por RMN. Verificou-se que se tratava do composto **32**, ou seja, formou-se o intermediário da reação, sendo este intermediário estável demais para se dar o ataque da azida. Nem mesmo com adição de azida de sódio nem por aquecimento se verificou a conversão para a correspondente azida. Deste modo, por ³¹P-RMN verificou-se um sinal de fósforo a -12,09 ppm (anexo **A1.21**) e, o aparecimento de sinais na zona dos aromáticos (7,41-7,18 ppm), o que confirmou que se trata do composto com o grupo difenil fosfato.

Esquema 12: Síntese do composto **32**.

A partir deste procedimento, é possível introduzir o grupo difenil fosfato neste tipo de substratos, visto que o produto formado é um composto extremamente estável. Assim, decidiu-se aproveitar este procedimento para a obtenção de derivados de difenil fosfato para posterior conversão em isonucleótidos por derivatização em C-3. Sendo assim, o composto **33** foi obtido utilizando este procedimento (**esquema 13**). No entanto, foi necessário adicionar mais equivalentes e aquecer a 40°C para se verificar uma progressão da reação. Foi verificado por ³¹P-RMN, o aparecimento de um pico a -12,06 ppm e os sinais dos grupos aromáticos por ¹H-RMN a 7,38-7,19 ppm (anexo **A1.22**). O composto **34** foi obtido através de *click chemistry*, originando regioseletivamente o triazole 1,4-dissubstituído. Verificou-se assim o aparecimento do sinal do triazole no espectro de ¹H-RMN, a 7,54 ppm e os respectivos sinais do benzilo a 7,36-7,18 ppm e a 5,54 ppm (anexo **A1.23**) e no espectro de ¹³C-RMN, verificou-se a presença dos sinais a 134,58 ppm e 123,01 ppm, correspondentes aos sinais do triazole. O sinal a 123,01 ppm, respeitante a C-3', foi crucial na identificação do regioisômero obtido, pois é característico de triazoles 1,4-dissubstituídos. É ainda possível verificar o acoplamento do fósforo com os carbonos quaternários dos grupos fenilo dando origem a dois dubletos (150,39 ppm e 150,32 ppm) com J_{C,P}= 7,51 Hz e J_{C,P}= 7,41 Hz, como também o acoplamento entre os carbonos 4 (78,09 ppm) e 5 (65,56 ppm) do açúcar com constantes de acoplamento de J_{C-4,P}=9,66 Hz e J_{C-5,P}=9,66 Hz.

Esquema 13: Síntese do composto **34**.

De forma a obter análogos destes compostos (**33** e **34**) contendo grupos etilo na funcionalidade fosfato, utilizou-se o reagente clorofosfato de dietilo. Partindo de **13** e **14**, ambas as reações foram rápidas (cerca de 45min) e praticamente quantitativas levando à obtenção dos correspondentes dietil fosfatos **35** e **36** (**esquema 14**). O aparecimento dos sinais por volta dos 4 ppm e dos 1,3 ppm, correspondentes aos grupos etilo (anexos **A1.24** e **A1.25**) no ^1H -RMN e, os sinais de fósforo -1,21 ppm (**35**) e -1,18 ppm (**36**), confirmaram a presença do grupo dietil fosfato.

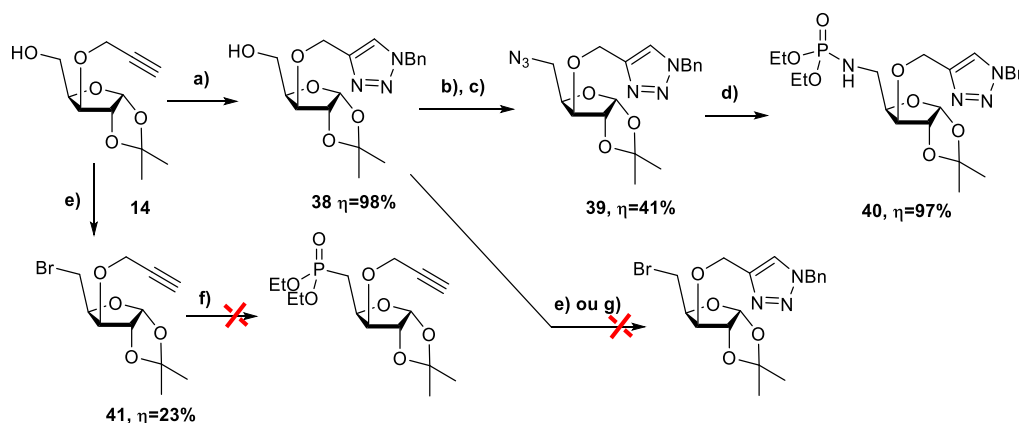


Esquema 14: Síntese dos compostos **35**, **36** e **37**.

Foi introduzido o grupo triazole, dando origem, regioselectivamente, ao composto **37**, através do mesmo procedimento utilizado para o composto **34** (anexo **A1.26**).

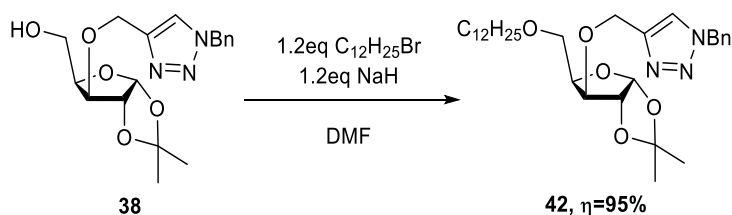
De forma a obter um análogo de **34** e **37** contendo um grupo fosforamidato em C-5 e tendo em conta que não se poderia colocar o grupo azida na posição 5 partindo do composto **14**, fez-se primeiro a reação de *click* cicloadição, conduzindo ao triazole **38**, seguida de tosilação e azidação. Mesmo assim, é de notar que o composto **39** é obtido com rendimento de 41%, ou seja, mesmo colocando o triazole na posição 3, continuam a existir problemas na formação da azida. Porém, o correspondente fosforamidato foi obtido com sucesso, tendo sido possível verificar um sinal no espectro de ^{31}P -RMN a 9,10 ppm e os correspondentes sinais dos grupos etilo (anexo **A1.29**) nos espectros de ^1H e ^{13}C -RMN. Verificou-se o acoplamento entre o carbono 4 e o fósforo, aparecendo a 79,69 ppm no ^{13}C -RMN, com $J_{\text{C-4,P}}=5,07$ Hz.

De forma a obter um derivado fosfonato, partiu-se do composto **14** e, como a estratégia sintética consistia em utilizar a reação de Arbuzov, fez-se a bromação da posição 5. No entanto, como é possível verificar no **esquema 15**, esta reação tem um rendimento baixo, sendo visível por TLC produtos resultantes de degradação e mudança de cor da mistura reacional. Após a obtenção do composto **41**, procedeu-se à reação de Arbuzov, mas, apesar de ser visível por TLC alguma formação de um produto, após a coluna de cromatografia, foi possível verificar que praticamente nada se converteu no produto desejado. Partindo do composto **38**, verificou-se por TLC que não existia formação do produto desejado, mas sim degradação, utilizando tanto o procedimento descrito em e) como o descrito em g). Deste modo, a obtenção do fosfonato não foi possível.



Esquema 15: Síntese dos compostos **38**, **39**, **40** e **41**. Reagentes e condições: **a)** 1,2eq BnN_3 , CuI/A-21 , DCM; **b)** 2eq TsCl , py; **c)** 3eq NaN_3 , DMF, 80°C ; **d)** 5eq P(OEt)_3 , DCM; **e)** 2eq CBr_4 , 2eq PPh_3 , DCM. **f)** P(OEt)_3 , 110°C ; **g)** 1.1eq PBr_3 , DCM, 0°C .

Partindo do composto **38**, introduziu-se um grupo *O*-dodecilo em C-5 de forma a obter um isonucleósido com uma cadeia longa (**esquema 16**), o que poderá possibilitar a sua entrada pelas membranas celulares, sem o auxílio de transportadores de nucleósidos. A obtenção do composto **42** foi feita com sucesso (anexo **A1.31**).

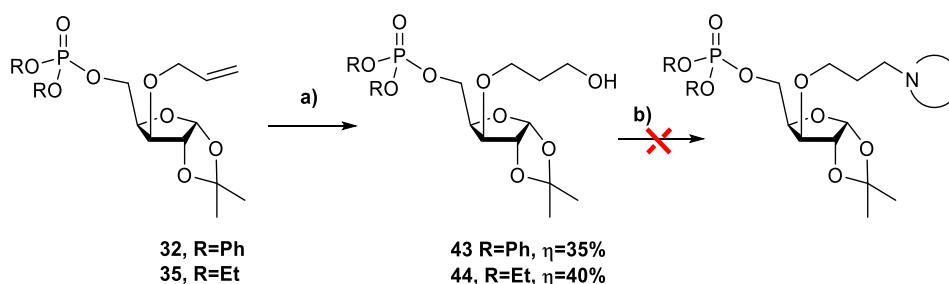


Esquema 16: Síntese do composto **42**.

2.5. Reações de hidroboração-oxidação

De forma a obter os isonucleótidos contendo uma unidade de purina ou pirimidina numa *O*-ramificação da posição 3, incluindo um espaçador propilo entre *O*-3 e a base azotada, e partindo dos compostos **32** e **35**, foi necessário introduzir um grupo hidroxilo terminal, para ser possível efetuar seguidamente a reação de Mitsunobu. Para isso, é necessário recorrer a uma hidratação anti-Markovnikov recorrendo a uma hidroboração-oxidação. Começou por se utilizar borano (1M em THF), com posterior adição do hidróxido de sódio e peróxido de hidrogénio, mas não se verificou nenhum produto formado por TLC, nem do produto intermediário com o borano, nem do produto resultante da oxidação. Utilizando o procedimento descrito no **esquema 17**, verificou-se formação dos produtos intermediários passado 1h, tendo sido observada a conversão destes nos

produtos **43** e **44**. Porém, esta conversão não é total e, para além disso, os compostos têm tendência a ficar retidos na coluna, sendo necessário utilizar metanol e uma coluna com uma altura relativamente pequena de sílica para a sua purificação. Os respetivos espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN indicaram a presença de uma cadeia propílica e o desaparecimento dos sinais dos prótons característicos da ligação dupla no grupo alilo.



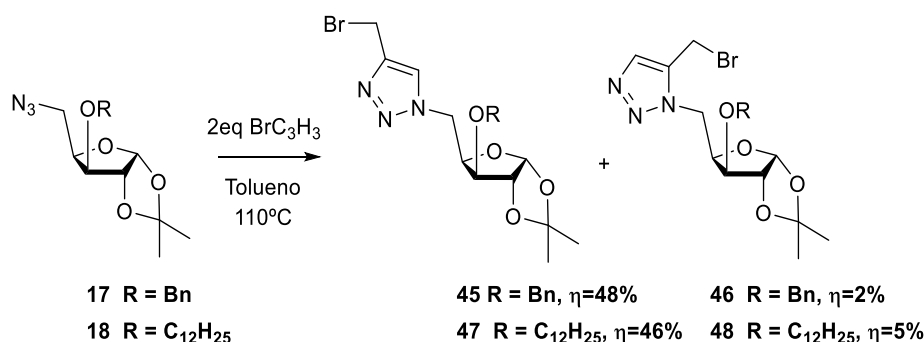
Esquema 17: Síntese dos compostos **43** e **44** – Hidroboração-oxidação. **a)** i. NaBH_4 , $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$, THF, 30°C ; ii. NaOH , 5%aq, H_2O_2 . **b)** 2eq teobromina ou 2-acetoamido-6-cloropurina, 2eq PPh_3 , 2eq DEAD, THF.

Quando se utilizou a reação de Mitsunobu para estes compostos, não se verificou a formação de nenhum produto, o que sugere que possivelmente o grupo fosfato tenha alguma interferência na reação. Deste modo, provavelmente mudando a abordagem sintética será possível introduzir a base azotada antes da introdução do grupo fosfato, começando, por exemplo, por proteger a posição 5 com o grupo tritilo (possivelmente resistente às condições de hidroboração-oxidação e de Mitsunobu), partindo do composto **13**, e após a introdução da base azotada, desproteger e inserir o grupo fosfato pretendido.

2.6. Síntese de análogos de nucleótidos

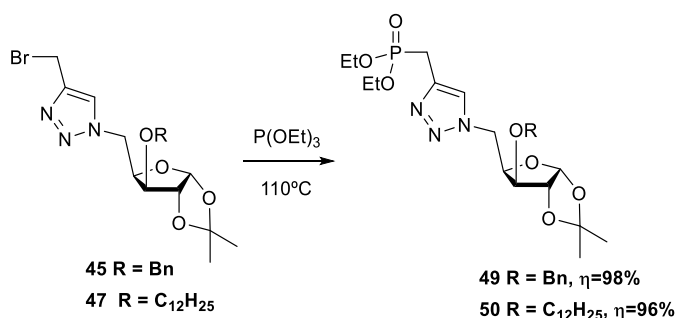
2.6.1. Síntese de análogos contendo o sistema (triazolil)metil fosfonato

Partindo dos compostos **17** e **18**, foi possível obter os correspondentes (bromometil)triazoles através de uma reação de cicloadição térmica, utilizando brometo de propargilo e tolueno como solvente (**esquema 18**). Foram obtidos os dois regioisómeros, o 1,4-dissubstituído e o 1,5-dissubstituído, sendo que o primeiro foi obtido maioritariamente e o segundo de forma quase vestigial. Mesmo assim, foi possível separar, em ambos os casos, os dois regioisómeros, porém, o regioisómero minoritário apresenta alguma contaminação nos espectros de RMN (anexos **A1.34-A1.37**). Para além disso, os compostos são suscetíveis a alguma degradação caso estejam expostos à luz e temperatura ambiente durante longos períodos de tempo.



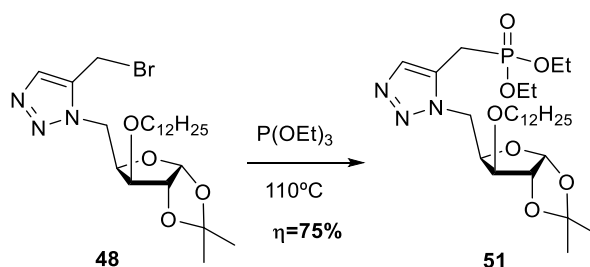
Esquema 18: Síntese de (bromometil)triazoles **45-48**.

Partindo dos compostos maioritários **45** e **47**, foram sintetizados os respectivos fosfonatos utilizando a reação de Arbuzov (**esquema 19**). Os compostos desejados foram obtidos com sucesso, tendo sido caracterizados por RMN. Verificou-se no ³¹P-RMN o sinal do fósforo a 24,87 ppm para o composto **49** e a 24,90 ppm para o composto **50**. Também é possível verificar pelo ¹³C-RMN a interação entre o fósforo e o CH₂ vizinho, com sinais (dobletos) a 23,44 ppm e constantes de acoplamento de J_{C,P}=143,40 Hz (**49**) e J_{C,P}=142,43 Hz (**50**), bem como a sua interação com os carbonos do triazole a 138,40/138,36 ppm (**49/50**), com constantes de J_{C,P}= 7,22 Hz/7,53 Hz e a 123,83/123,80 ppm com constantes de J_{C,P}= 4,23 Hz/3,38 Hz (anexos **A1.38** e **A1.39**). Estes sinais do triazole com desvios químicos por volta de 138 ppm e 123 ppm são característicos de triazoles 1,4-dissubstituídos⁶⁵. No espectro de ¹H-RMN também está presente a interação entre o fósforo e os prótons do CH₂ vizinho, aparecendo um dd por volta dos 3,41-3,26 ppm com constantes J_{H'a,H'b}=20,30 Hz e J_{H,P}=15,68 Hz, para ambos os casos.



Esquema 19: Síntese dos análogos contendo (triazolil)metil fosfonato 1,4-dissubstituídos (**49** e **50**).

Também foi possível, a partir do regioisômero minoritário (**48**), obter o correspondente fosfonato utilizando o mesmo procedimento (**esquema 20**).

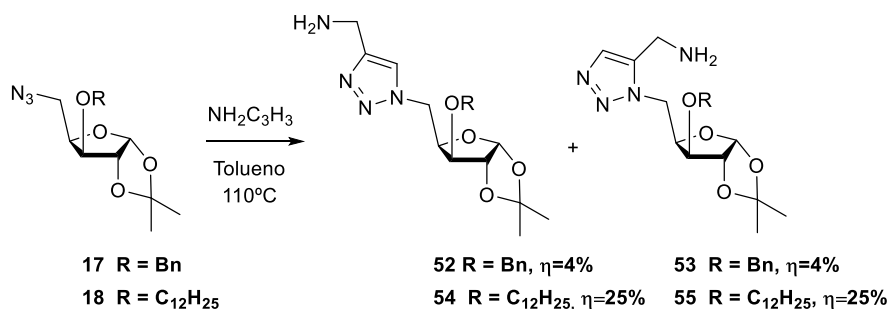


Esquema 20: Síntese dos análogos contendo (triazolil)metil fosfonato 1,5-dissubstituído (**51**).

É possível ver no espectro de ^{31}P -RMN o sinal do fósforo a 22,19 ppm e as interações do fósforo com os carbonos vizinhos, com constantes de acoplamento semelhantes às obtidas para os compostos **49** e **50** (anexo A1.40). Para os sinais do triazole no espectro de ^{13}C -RMN, os desvios químicos são 133,88 ppm e 129,31 ppm, confirmando de que se trata de um triazole 1,5-dissubstituído.

2.6.2. Síntese dos análogos contendo o sistema (triazolil)metil fosforamidato

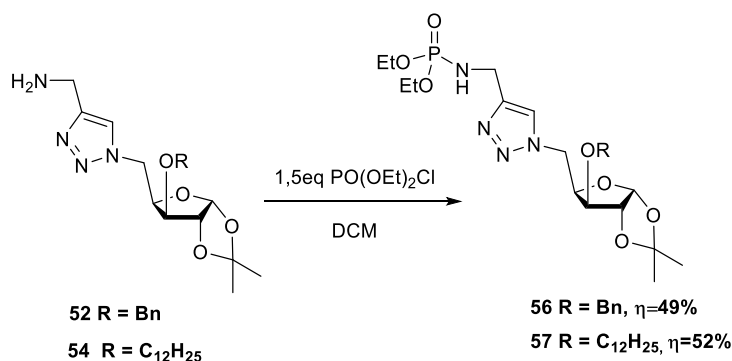
Partindo dos compostos **17** e **18**, também foi possível obter os correspondentes (aminometil)triazoles através de ciclização térmica, utilizando propargilamina (**esquema 21**). Foram obtidos os regioisômeros 1,4- e 1,5-dissubstituídos, mas, ao contrário do que aconteceu com os análogos (bromometil)triazoles, estes regioisômeros formaram-se na mesma proporção. No entanto, a conversão para os compostos desejados é baixa, sendo que para o composto **18** existe uma maior conversão do que para o composto **17**, tendo sido respectivamente de 50% (originando **54-55**) e 8% (originando **52-53**). Para a síntese de **54-55** foram recuperados 240mg de **18**, enquanto que na reação que conduziu a **52-53**, foram recuperados 480mg de **17**, partindo de 600mg para ambos os casos. Para além disso, a adição de mais equivalentes de propargilamina e o aumento do tempo reacional não só não promovem a conversão para os produtos desejados, como também prejudicam a purificação dos mesmos. Mesmo assim foi possível separar os compostos e caracterizá-los por RMN (anexo A1.41-A1.44).



Esquema 21: Síntese dos análogos contendo (amino)metil triazoles **52-55**.

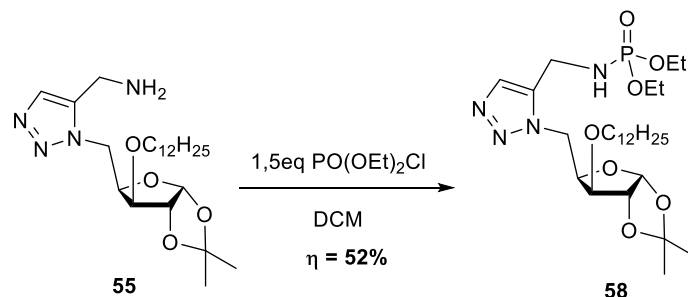
A partir dos compostos **52** e **54** foi possível obter os respectivos fosforamidatos (**esquema 22**). Porém, não se dá uma conversão total dos compostos para os compostos desejados, nem após a adição de mais equivalentes de clorofosfato de dietilo ou de DMAP. A utilização de trietilamina promove a formação de mais produtos secundários e, mesmo aumentando o tempo reacional não se verifica nenhum progresso. É de salientar também que os compostos desejados ficam retidos na coluna e só é possível retirá-los quando se adiciona metanol, o que dificulta a sua purificação, porque deste modo, torna-se difícil remover o clorofosfato de dietilo, que apresenta o mesmo comportamento e que tem um R_f semelhante ao dos compostos. Mesmo assim, os compostos foram purificados e caracterizados por RMN.

É possível verificar no espectro de ³¹P-RMN o sinal do fósforo a 8,19 ppm para ambos os casos. Em ambos os casos, também aparece no espectro de ¹H-RMN, por volta dos 3,20-3,14 ppm, um sinal que corresponde ao próton ligado ao azoto do grupo fosforamidato. No espectro do composto **57** aparece um dt nos 3,21-3,15 ppm com constantes de acoplamento J_{NH,P}=13,17 Hz e J_{NH,H3'a}= J_{NH,H3'b}=6,48 Hz. Também é possível ver a interação do carbono do triazole (Cq) com o fósforo, no espectro de ¹³C-RMN, aparecendo por volta dos 146 ppm com constantes de J_{C,P}=6,15 Hz (anexo A1.46).



Esquema 22: Síntese dos análogos contendo (triazolil)metil fosforamidato 1,4 dissustituídos **56** e **57**.

Partindo do regioisómero 1,5-dissubstituído (**55**) foi possível obter o respetivo fosforamidato, usando o mesmo procedimento utilizado anteriormente (**esquema 23**).

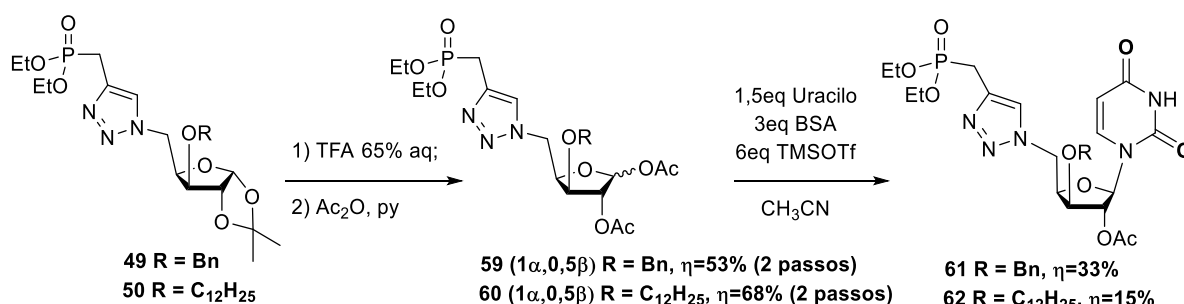


Esquema 23: Síntese dos análogos contendo (triazolil)metil fosforamidato 1,5-dissubstituído (**58**).

No espetro de ^{31}P -RMN, é possível verificar o sinal do fósforo a 7,82ppm como também a interação entre os prótons do grupo metileno com o próton ligado ao átomo de azoto, no ^1H -RMN, dando origem a um sistema ABX a 4,25-4,19 ppm (parte A e B), com constantes de $J_{\text{Ha,Hb}}=14,95$ Hz e $J_{\text{H,NH}}=2,30$ Hz (anexo **A1.47**).

2.7. N-Glicosilação

De forma a introduzir uma base azotada na posição anomérica dos derivados de xilofuranose contendo unidades de (triazolil)metil fosfonato, começou por se remover o grupo 1,2-*O*-isopropilideno dos compostos **49** e **50** por meio de hidrólise em meio ácido, a qual foi seguida de acetilação conduzindo aos compostos **59 α,β** e **60 α,β** com proporções dos anómeros α/β de 1:0,5 em ambos os casos (**esquema 24**). De seguida, procedeu-se às reações de *N*-glicosilação, utilizando o uracilo como base azotada e bis(trimetilsilil)acetamida como agente de sililação. Quando este se encontra sililado (**Esquema 24**) devido ao impedimento estereoquímico no átomo de azoto na posição 3, apenas se dá a ligação do uracilo à unidade glicosídica a partir de N-1. Apesar de só se ter verificado a formação de apenas um composto, como era previsto, por TLC, os rendimentos foram baixos, devido ao facto de os compostos ficarem retidos na coluna, o que possivelmente poderá ser ultrapassado ao se utilizar uma coluna de fase reversa.

Esquema 25: Síntese dos compostos **61** e **62**.

Apesar desse problema, os compostos foram caracterizados por RMN, sendo visível em ambos os casos o aparecimento dos picos correspondentes ao uracilo no espectro de ¹H-RMN, surgindo a 9,23 ppm (**61**) e 8,71 ppm (**62**) o próton do NH, e por volta dos 7,60 ppm e 5,70 ppm os dupletos correspondentes aos prótons H-6 e H-5, respetivamente, com constantes por volta dos 8 Hz (anexos **A1.50** e **A1.51**). O facto de o próton anomérico ser um singlete, comprova que se obteve apenas o anómero β , aparecendo por volta dos 6,10 ppm. Verificou-se também, por HMBC, as correlações entre o próton anomérico e C-6/C-2, o que confirma a regioquímica da ligação N-glicosídica envolvendo N-1.

2.8. Docking Molecular

De forma a prever a afinidade dos compostos em estudo com as enzimas alvo, CDK2 e GSK3 β , efetuaram-se estudos de *docking* tendo em conta 3 diferentes conjuntos de moléculas (denominados SETs), que se encontram apresentados nas figuras **21** e **22**. Como alvos definiram-se 3 estruturas de uma CDK2 e uma estrutura de uma GSK3 β . Os detalhes computacionais encontram-se no Capítulo 4 (4.2. Metodologia – *Docking Molecular*).

O SET1 é constituído pelos guanidino açúcares (66 compostos, dos quais 5 foram sintetizados), com diferentes substituintes e por uma biblioteca de compostos retirados da PubChem, que foi obtida tendo em conta as estruturas base representadas (constituída por 2073 compostos). O SET2 é constituído pelos análogos contendo os metil triazoles com diferentes substituintes (60 compostos, dos quais 18 foram sintetizados), pelo triazole intramolecular (**31**) e pela mesma biblioteca de compostos da PubChem que o SET1, visto que é constituído por estruturas base idênticas às destes compostos.

O SET3, por sua vez, é constituído pelos isonucleótidos contendo diferentes substituintes (54 compostos, dos quais 3 foram sintetizados), pelo composto **42** e pela biblioteca de compostos da PubChem (constituída por 48 compostos) contendo os motivos estruturais representados (figura **22**).

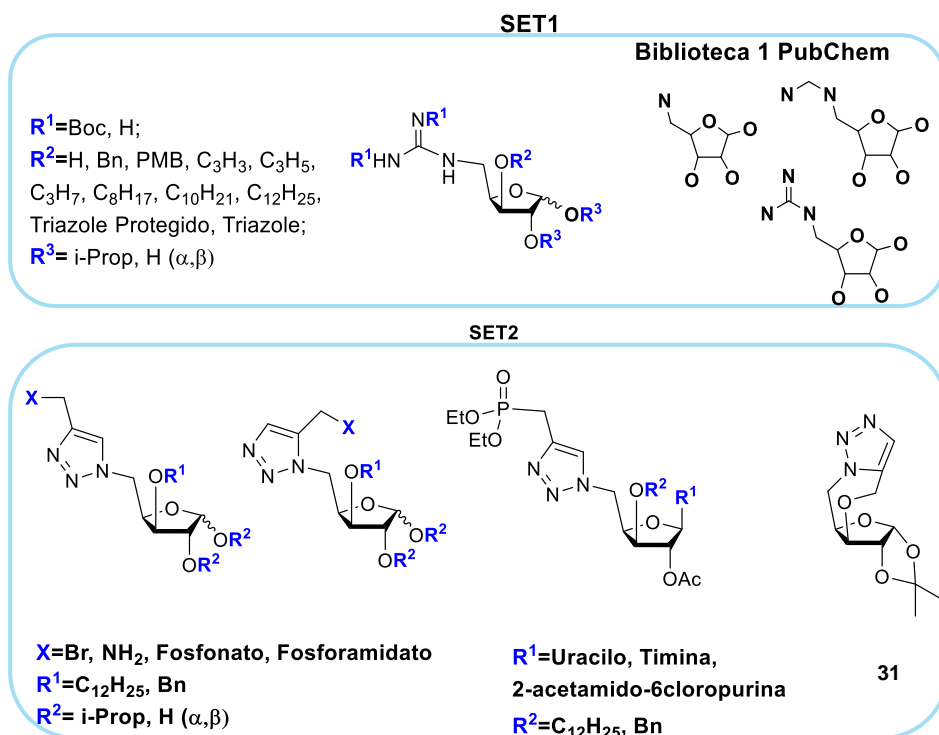


Figura 21: Representação dos SET1 e 2, contendo 2146 e 2141 compostos, respectivamente.

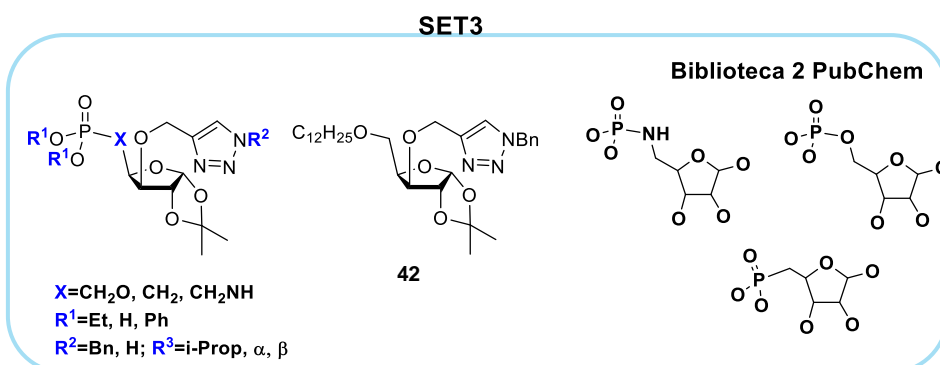


Figura 22: Representação do SET3. No total o SET3 contém 106 compostos.

Realizaram-se corridas de *docking* molecular e os resultados obtidos encontram-se resumidos nas **tabelas 2 e 3**. A numeração dos compostos usada para cada SET, encontra-se no **anexo B2**. Para os compostos da PubChem, mantiveram-se os respectivos códigos CID. No **anexo B3** encontram-se as estruturas dos compostos mencionados nas **tabelas 2 e 3**. Como está descrito no **anexo B1**, os códigos 4EOQ, 4EOR e 4EOS correspondem a estruturas de raios-X da CDK2 com o ATP, com o inibidor 4-{[6-(ciclo-hexilmetoxi)-9H-purina-2-il]amino}benzenossulfonamida (ASP)⁶⁷ e com o inibidor (5*E*)-5-(quinolin-6-il-metilideno)-2-(tiofen-2-il-metilamino)-1,3-tiazol-4-ona (1RO)^{67,68}, respectivamente, e o código 6B8J corresponde à enzima GSK3 β , cuja estrutura de raios-X está complexada com o inibidor 6-(2-{[4-(2,4-diclorofenil)-5-(4-metil-1*H*-imidazol-2-il)pirimidin-2-il]amino}etilamino)piridina-3-carbonitrilo (65C ou CHIR99021)²⁵.

CAPÍTULO 2

Tabela 2: Valores obtidos para o *docking* dos SET1 e SET2. O símbolo # corresponde ao *rank* do composto. Os valores obtidos para a afinidade encontram-se entre parêntesis e em itálico (Kcal/mol). ID – corresponde à numeração do composto ou ao CID (compostos da PubChem). Os inibidores correspondes às estruturas cristalinas de cada enzima ou o ATP encontram-se a negrito.

| SET1 | | | | | | | | SET2 | | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 4EOQ | | 4EOR | | 4EOS | | 6B8J | | 4EOQ | | 4EOR | | 4EOS | | 6B8J | |
| # | ID | # | ID | # | ID | # | ID | # | ID | # | ID | # | ID | # | ID |
| 1 (-11,1) | 102041527 | 1 (-11,3) | 122368681 | 1 (-11,1) | 102041527 | 1 (-11,5) | 129886273 | 1 (-11,1) | 102041527 | 1 (-11,3) | 122368681 | 1 (-11,1) | 102041527 | 1 (-11,5) | 129886273 |
| 2 (-11,0) | 102041534 | 2 (-11,2) | 101848699 | 2 (-11,0) | 102041534 | 2 (-10,8) | 102041527 | 2 (-11,1) | 102041534 | 2 (-11,2) | 101848699 | 2 (-11,0) | 102041534 | 2 (-10,8) | 102041527 |
| 3 (-10,8) | 24795629 | 3 (-11,0) | 102041539 | 3 (-10,8) | 24795629 | 3 (-10,8) | 102041538 | 3 (-10,8) | 24795629 | 3 (-11,0) | 102041539 | 3 (-10,8) | 24795629 | 3 (-10,8) | 102041538 |
| 4 (-10,7) | 102328059 | 4 (-10,9) | 71732185 | 4 (-10,7) | 102328059 | 4 (-10,8) | 122368681 | 4 (-10,7) | 102328059 | 4 (-10,9) | 71732185 | 4 (-10,7) | 102328059 | 4 (-10,8) | 122368681 |
| 5 (-10,7) | 129838982 | 5 (-10,7) | 102456647 | 5 (-10,7) | 129838982 | 5 (-10,8) | 129838982 | 5 (-10,7) | 129838982 | 5 (-10,7) | 102456647 | 5 (-10,7) | 129838982 | 5 (-10,8) | 129838982 |
| 6 (-10,6) | 122368681 | 6 (-10,7) | 71732186 | 6 (-10,6) | 122368681 | 6 (-10,7) | 11372951 | 6 (-10,6) | 122368681 | 6 (-10,7) | 71732186 | 6 (-10,6) | 122368681 | 6 (-10,7) | 11372951 |
| (...) | | (...) | | (...) | | (...) | | (...) | | (...) | | (...) | | (...) | |
| 42 (-9,8) | A58 | 66 (-9,5) | A58 | 42 (-9,6) | A58 | 91 (-9,3) | 65C | 261 (-8,8) | B60 | 82 (-9,4) | 4SP | 133 (-9,1) | 4SP | 91 (-9,3) | 65C |
| 68 (-9,5) | A56 | 83 (-9,4) | 4SP | 68 (-9,5) | A56 | 194 (-8,9) | A56 | 262 (-8,8) | B34 | 134 (-9,2) | B10 | 244 (-8,8) | 65C | 380 (-8,4) | B56 |
| 150 (-9,1) | A59 | 186 (-9,0) | A10 | 135 (-9,1) | 4SP | 259 (-8,7) | A58 | 317 (-8,7) | B46 | 163 (-9,1) | B4 | 261 (-8,8) | B60 | 381 (-8,4) | B60 |
| 176 (-9,0) | A7 | 187 (-9,0) | A56 | 150 (-9,1) | A59 | 289 (-8,6) | A57 | 318 (-8,7) | B10 | 187 (-9,0) | B22 | 262 (-8,8) | B34 | 439 (-8,3) | B58 |
| 260 (-8,8) | A60 | 233 (-8,9) | A16 | 176 (-9,0) | A7 | 440 (-8,3) | A16 | 363 (-8,6) | B54 | 233 (-8,9) | B16 | 317 (-8,7) | B46 | 440 (-8,3) | B54 |
| 320 (-8,7) | A10 | 273 (-8,8) | A57 | 248 (-8,8) | 65C | 441 (-8,3) | A7 | 364 (-8,6) | B16 | 234 (-8,9) | B46 | 318 (-8,7) | B10 | 441 (-8,3) | B10 |
| 321 (-8,7) | A57 | 391 (-8,6) | A60 | 265 (-8,8) | A60 | 507 (-8,2) | A59 | 365 (-8,6) | B4 | 325 (-8,7) | B54 | 363 (-8,7) | B54 | 555 (-8,1) | B50 |
| 414 (-8,5) | A13 | 392 (-8,6) | A59 | 581 (-8,2) | 1RO | 508 (-8,2) | A8 | 366 (-8,6) | B22 | 392 (-8,6) | B58 | 583 (-8,2) | 1RO | 555 (-8,1) | B52 |
| 948 (-7,7) | ATP | 656 (-8,1) | ATP | 948 (-7,7) | ATP | 760 (-7,8) | ATP | 948 (-7,7) | ATP | 661 (-8,1) | ATP | 948 (-7,7) | ATP | 756 (-7,8) | ATP |

Tabela 3: Valores obtidos para o SET3. O símbolo # corresponde ao *rank* do composto. Os valores obtidos para a afinidade encontram-se entre parêntesis e em itálico (Kcal/mol). ID – corresponde à numeração do composto ou ao CID (compostos da PubChem). Os inibidores correspondes às estruturas cristalinas de cada enzima ou o ATP encontram-se a negrito.

| SET3 | | | | | | | |
|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|
| 4EOQ | | 4EOR | | 4EOS | | 6B8J | |
| # | ID | # | ID | # | ID | # | ID |
| 1 (-9,6) | C7 | 1 (-10,1) | C7 | 1 (-9,6) | C7 | 1 (-9,6) | C7 |
| 2 (-9,2) | C9 | 2 (-9,4) | 4SP | 2 (-9,2) | C9 | 2 (-9,4) | C9 |
| 3 (-9,2) | C1 | 3 (-9,1) | 65C | 3 (-9,2) | C1 | 3 (-9,4) | C1 |
| 4 (-9,1) | 4SP | 4 (-9) | 11144287 | 4 (-9,1) | 4SP | 4 (-9,3) | 65C |
| 5 (-9,1) | C50 | 5 (-8,7) | 23257264 | 5 (-9,1) | C50 | 5 (-9,2) | C10 |
| 6 (-9) | C31 | 6 (-8,5) | 1RO | 6 (-9,0) | C31 | 6 (-9,1) | 4SP |
| 7 (-9) | C10 | 7 (-8,4) | 21591561 | 7 (-9,0) | C10 | 7 (-8,8) | 23257264 |
| 8 (-8,9) | C32 | 8 (-8,4) | 47 | 8 (-8,9) | C14 | 8 (-8,7) | 21591561 |
| 9 (-8,9) | C49 | 9 (-8,2) | 11733708 | 9 (-8,9) | C49 | 9 (-8,6) | 1RO |
| 10 (-8,8) | 65C | 10 (-8,2) | 23245130 | 10 (-8,8) | 65C | 10 (-8,5) | C11 |
| 11 (-8,8) | C13 | 11 (-8,2) | C36 | 11 (-8,8) | 11144287 | (...) | |
| 12 (-8,6) | 11144287 | 12 (-8,2) | C20 | 12 (-8,6) | 21591561 | 14 (-8,4) | C3 |
| 13 (-8,6) | 21591561 | 13 (-8,2) | C32 | 13 (-8,6) | 23257264 | 16 (-8,2) | C19 |
| 14 (-8,6) | 23257264 | 14 (-8,2) | ATP | 32 (-8,2) | 1RO | 17 (-8,2) | C31 |
| 55 (-7,7) | ATP | 15 (-8,1) | C26 | 56 (-7,6) | ATP | 31 (-7,8) | ATP |

Na **tabela 2** é possível observar que os melhores compostos para cada enzima são compostos da biblioteca da PubChem. Para além disso, os SET1 e 2 partilham essa mesma biblioteca e, deste modo, os compostos com melhores ranks são iguais: 4EOQ – 102041527; 4EOR – 122368681; 4EOS – 102041527 e 6B8J – 129886273. Como é possível verificar no **anexo B3**, todos estes compostos partilham o facto de terem vários substituintes aromáticos. Também é possível verificar que o composto que aparece mais vezes nos primeiros 6 melhores compostos é o 122368681 e que este é constituído por um grupo naftilo e por um grupo triazole (**anexo B3**).

Para efeitos de análise, foram geradas imagens das estruturas provenientes do *docking*, utilizando o programa PyMOL, considerando a pose de mais baixa energia obtida para os compostos em estudo, comparando-as com a pose obtida para o ATP. Como foi referido anteriormente, os compostos em estudo mimetizam o ATP tendo como racional a possível inibição da enzima ligando-se à cinase no seu local de ligação, não permitindo assim a fosforilação dos substratos. Desta forma, a pose do *docking* é uma previsão da possível orientação e conformação do ATP nos alvos 4EOR, 4EOS e 6B8J. Excecionalmente, a enzima 4EOQ, a orientação e conformação do ATP obtida por raios-X, foi usada para comparação. No entanto, ao sobrepor a estrutura obtida através do PDB de origem (coordenadas obtidas por raios-X) com os ficheiros obtidos através do *docking* molecular (**anexos B4.1-B4.4**), mostra que os resultados são semelhantes, ou seja, permite-nos confiar nas poses obtidas para o ATP nos outros sistemas.

É possível visualizar na **figura 23** a sobreposição do composto 122368681 com o ATP para as enzimas 4EOR (**A**) e 6B8J (**B**). Na imagem **A**, verifica-se que a zona dos grupos aromáticos do composto está sobreposta com a zona do grupo trifosfato do ATP. No **anexo B 4.5**, encontram-se representadas estruturas, em que é possível ver a interação do composto e do ATP com alguns resíduos de aminoácidos circundantes. É possível ver na imagem **a** do **anexo B 4.5** que o grupo naftilo se encontra mais para dentro da enzima, fazendo possivelmente várias interações hidrofóbicas com muitos resíduos apolares que se encontram à volta. O grupo triazole, possivelmente, interage com uma lisina (Lys34) através de uma ligação de hidrogénio e com um aspartato (Asp142) por interações eletrostáticas. Por sua vez, o oxigénio do açúcar encontra-se próximo de uma glutamina (Glu13) com a qual poderá fazer ligações de hidrogénio. Na **figura 23 B**, por sua vez, é visível o facto de o grupo naftilo deste composto coincidir com a adenina do ATP. No **anexo B 4.5**, na imagem **b**, é possível observar que o grupo naftilo se encontra mais para dentro da enzima, rodeado de resíduos apolares e fazendo interações hidrofóbicas com uma isoleucina (Ile26), uma alanina (Ala47), uma leucina (Leu149), uma valina (Val174) e uma tirosina (Tyr95). Possivelmente, o grupo triazole deste composto, interage com uma fenilalanina (Phe31), fazendo empilhamento π (paralelo) e o grupo isopropilideno, que se encontra mais para fora da enzima, encontra-se próximo do resíduo treonina (Thr99) com o qual poderá fazer ligações de hidrogénio.

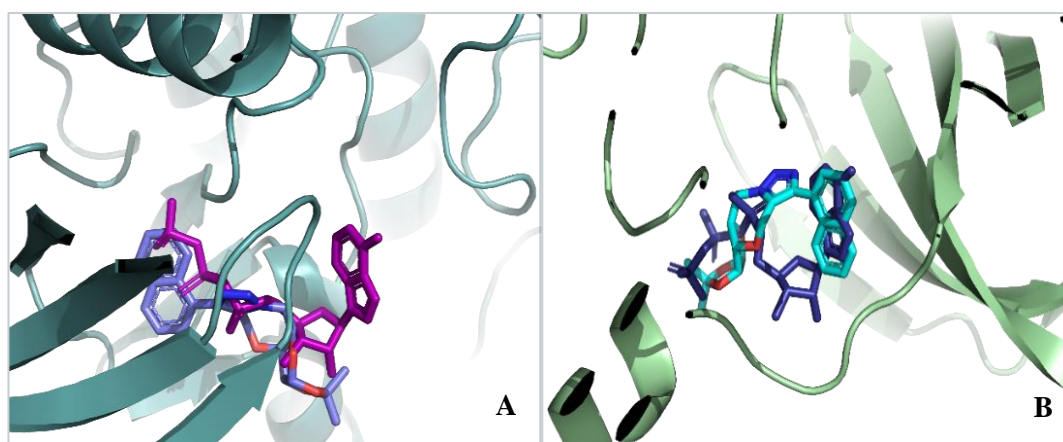


Figura 23: **A** – Sobreposição do composto 122368681 com o ATP (a lilás), no local de ligação do ATP da enzima 4EOR. **B** – Sobreposição do composto 122368681 com o ATP (a azul escuro), no local de ligação com o ATP da enzima 6B8J.

Considerando agora apenas os compostos em estudo e relativamente ao SET1, os melhores valores foram: 4EOQ – A58; 4EOR – A58; 4EOS – A58 e 6B8J – A56, sendo de notar que, tanto o composto A58 como o A56 aparecem sempre com valores idênticos de rank para todas as enzimas.

Na **figura 24** é possível visualizar a sobreposição do composto A58 com o ATP para as enzimas 4EOQ (**C**) e 6B8J (**D**). Na imagem **C** é possível observar que o grupo triazole protegido com o benzilo do composto A58 coincide com a adenina do ATP, sendo que o grupo guanidina desprotegida se encontra na zona da desoxirribose. No **anexo B4.6.**, na imagem **c**, é evidente que o grupo triazole protegido encontra-se mais para dentro da enzima, o que possivelmente se deve ao facto de nessa zona existirem muitos grupos apolares que vão interagir com o grupo benzilo, por interações hidrofóbicas e possível empilhamento π (paralelo) com o resíduo Phe77. O grupo triazole, por sua vez, encontra-se perto dos resíduos Leu80 e Glu78, com os quais possivelmente estabelece ligações de hidrogénio. Relativamente ao grupo guanidina, encontra-se próximo do resíduo Asp83, com o qual poderá estabelecer ligações de hidrogénio e interações eletrostáticas. Por sua vez, na imagem **D**, a guanidina do composto A58 encontra-se na zona do grupo trifosfato do ATP e a zona da xilofuranose deste composto encontra-se sobreposta à adenina do ATP. No **anexo B4.6.**, na imagem **d**, verifica-se que a zona do açúcar e da guanidina se encontra mais inserido na enzima, existindo muitos grupos apolares perto da zona do grupo isopropilideno, que possivelmente fazem interações hidrofóbicas com os grupos metilo. Também se verifica que a guanidina interage possivelmente com uma glutamina (Gln146), por ligações de hidrogénio. O grupo triazole, por sua vez, encontra-se próximo do resíduo Tyr95 podendo fazer ligações de hidrogénio. O grupo benzilo encontra-se perto de muitos resíduos apolares estabelecendo interações hidrofóbicas.

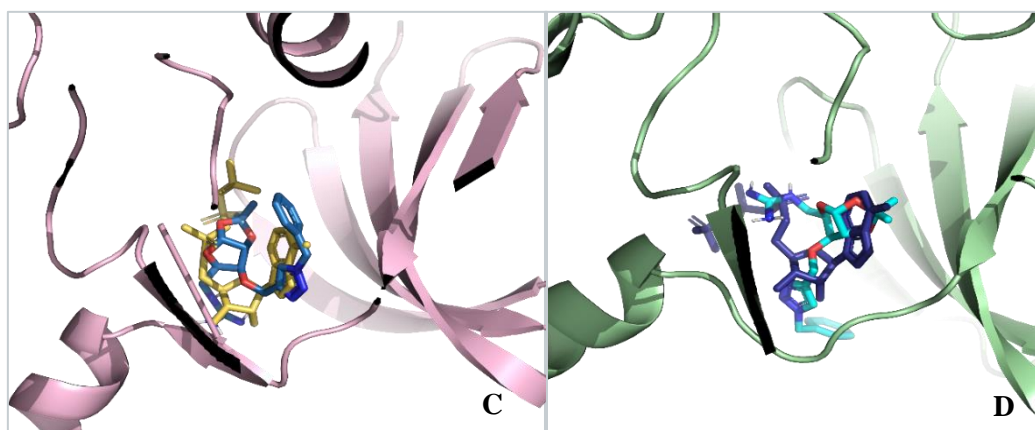


Figura 24: **C** – Sobreposição do composto A58 com o ATP (a amarelo), no local de ligação do ATP da enzima 4EOQ. **D** – Sobreposição do composto A58 com o ATP (a azul escuro), no local de ligação com o ATP da enzima 6B8J

De um modo geral, para o SET 1 é possível verificar que os compostos que contém grupos aromáticos são os que têm melhores resultados, existindo uma grande preferência para os compostos com o triazole substituído com um benzilo, na posição 3 do açúcar. Por outro lado, não se verifica uma preferência clara para o facto de a guanidina estar protegida ou não, ou de existirem alterações nas posições 1 e 2 do açúcar.

Como o objetivo do grupo guanidina é mimetizar a base azotada, esperar-se-ia que interagisse com a enzima de forma semelhante à da adenina do ATP. No entanto, ao analisar-se a interação do composto A58 com as estruturas da CDK2 estudadas (**anexo B4.7**), verificou-se que o grupo triazole protegido se encontra mais inserido na enzima, no local onde teoricamente a adenina interage (**anexo B4.7**), estabelecendo ligações de hidrogénio com os azotos do triazole e interações hidrofóbicas com o grupo benzilo. No entanto, ao analisar-se a possível interação deste composto com a estrutura da GSK3 β estudada, o composto tem uma orientação diferente, sendo que a zona do triazole protegido se encontra num local mais externo do local de ligação do ATP, existindo na mesma as interações descritas anteriormente. Adicionalmente, verifica-se que o grupo guanidina estabelece interações com resíduos mais polares (ligações de hidrogénio e interações electrostáticas), acabando por mimetizar o grupo trifosfato do ATP no caso das estruturas de CDK2 analisadas.

Relativamente ao SET2, os compostos com melhores resultados (considerando apenas os estudados) foram: 4EOQ – B60; 4EOR – B10; 4EOS – B60 e 6B8J – B56, sendo que os compostos que aparecem em todos os casos nos 7 melhores compostos em estudo escolhidos, são o B10 e o B54.

Na **figura 25** é possível visualizar a sobreposição do composto B10 com o ATP para as enzimas 4EOS (**E**) e 6B8J (**F**). Na imagem **E** é possível ver que o grupo benzilo do composto se encontra na zona do grupo trifosfato e o bromo metano triazole se encontra afastado do ATP. No **Anexo B 4.8.**, na imagem **e**, verifica-se que o grupo benzilo se encontra mais inserido no *pocket* da enzima, estando próximo de muitos resíduos apolares com os quais pode estabelecer interações hidrofóbicas, estando perto do resíduo Phe-80 e posicionado de forma a que possivelmente haja empilhamento- π (paralelo). O grupo (bromometil)triazole, encontra-se perto do resíduo Phe82, existindo também empilhamento- π (paralelo) do resíduo Leu83 com o qual poderá ter ligações de hidrogénio. Os grupos metilo do grupo isopropilideno encontram-se perto de grupos apolares com os quais também poderão estabelecer interações hidrofóbicas. Na imagem **F**, verifica-se que o grupo triazole coincide com a adenina do ATP, que a xilofuranose do composto B10 se encontra na zona dos trifosfatos e que o grupo benzilo se encontra mais afastado, neste caso, do ATP. No **Anexo B 4.8.**, na imagem **f**, é possível verificar que o grupo (bromometil)triazole se encontra mais inserido dentro do pocket da enzima e que possivelmente faz uma ligação de hidrogénio com a Tyr96. O grupo benzilo encontra-se próximo de vários resíduos apolares estabelecendo interações hidrofóbicas, bem como o grupo isopropilideno, onde os grupos metilo se encontram próximos do resíduo Phe31.

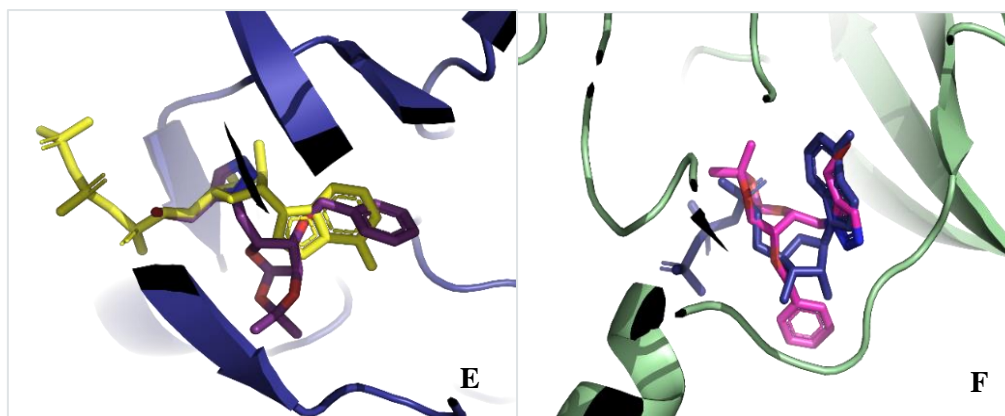


Figura 25: E – Sobreposição do composto B10 com o ATP (roxo), no local de ligação do ATP da enzima 4EOS. F – Sobreposição do composto B10 com o ATP (a azul escuro), no local de ligação com o ATP da enzima 6B8J

Como o composto B54 aparece em todos os casos e como para a enzima 6B8J, os compostos com melhores resultados contêm bases azotadas, foi analisada também a sua interação com esta enzima. Deste modo, na **figura 26**, sobretudo na imagem **H**, é possível ver que a timina deste composto se encontra na zona da adenina do ATP. Perto da timina encontram-se os resíduos Phe31, Lys49 e Val34, onde possivelmente existem interações hidrofóbicas e uma ligação de hidrogénio com o resíduo Asp-161. O grupo benzilo, por sua vez, encontra-se perto do resíduo Phe-31 e possivelmente faz empilhamento- π (perpendicular) e, na zona do grupo fosfonato, existem também resíduos polares como a Tyr101, Arg102 e Arg105 que possivelmente fazem ligações de hidrogénio. Desta forma, é possível que este composto consiga interagir com muitos resíduos de aminoácidos no local de ligação do ATP desta enzima, sobretudo a zona da timina, o que pode justificar o facto de compostos contendo bases azotadas tenham melhores valores para o caso da 6B8J.

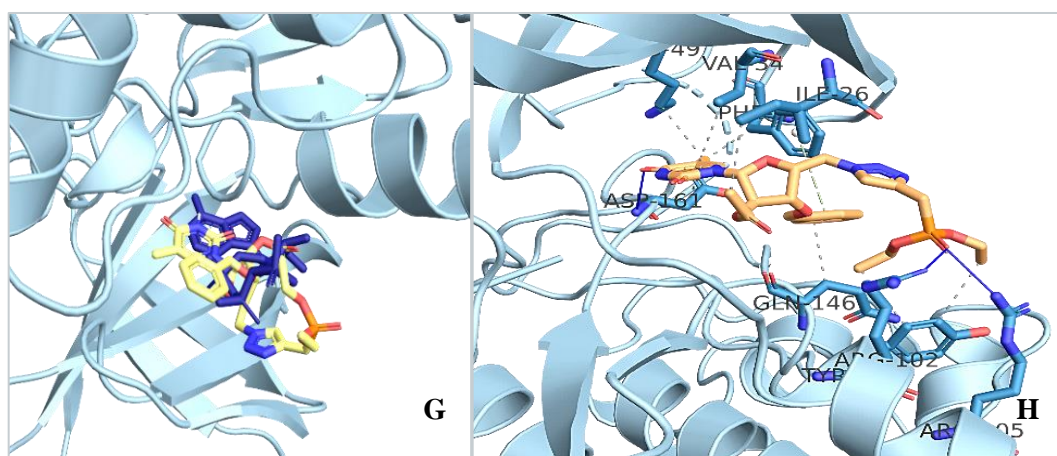


Figura 26: G – Sobreposição do composto B54 com o ATP (azul escuro), no local de ligação do ATP da enzima 6B8J. H – Resíduos dos amino ácidos no local de ligação do ATP.

De um modo geral, para o SET2, verifica-se que todos os compostos com melhores resultados têm o grupo benzilo como substituinte na posição 3 e que existe uma preferência para os

compostos contendo o grupo isopropilideno. Por outro lado, não se verifica nenhuma preferência por ser regioisomero 1,4 ou 1,5 nem pelo tipo de base azotada.

Observando os valores obtidos para o SET3, é possível ver que os compostos estudados aparecem sempre nos 15 primeiros lugares em termos de *rank*, sendo que o composto C7 aparece em primeiro lugar em todas as enzimas existindo, portanto, consenso. Na **figura 27**, é possível visualizar a sobreposição do composto C7 com o ATP para as enzimas 4EOR (**I**) e 6B8J (**J**). Na imagem **I** verifica-se que o grupo fosfato do composto encontra-se na zona do grupo trifosfato e a zona da xilofuranose encontra-se posicionada na zona da desoxirribose do ATP, sendo que o grupo triazole, por sua vez, se encontra afastado do ATP. No **anexo B 4.9.**, na imagem **g**, é possível observar que o grupo fosfato se encontra mais inserido na enzima e que os fenilos se encontram próximos de muitos resíduos apolares, existindo possivelmente interações hidrofóbicas. O grupo fosfato do composto encontra-se perto da Lys34, fazendo possíveis interações catião-dipolo e, perto da zona do grupo triazole protegido por um benzilo, encontra-se um resíduo Asp-83, sendo espectáveis interações eletrostáticas ou ligações de hidrogénio com os azotos do grupo triazole. O benzilo, encontra-se também rodeado de resíduos apolares e verifica-se que o oxigénio da xilofuranose se encontra próximo da Glu13, com quem faz ligações de hidrogénio. Na imagem **J** é possível ver que o grupo fosfato do composto encontra-se distribuído pela zona do trifosfato, desoxirribose e grupo adenina do ATP e que o benzilo do grupo triazole se encontra na zona desta base azotada. No **anexo B 4.9.**, na imagem **h**, verifica-se que os fenilos do grupo fosfato se encontram rodeados de resíduos apolares, estabelecendo interações hidrofóbicas. Também se verifica que o grupo isopropilideno se encontra próximo dos resíduos Thr-99 e Tyr-101, com quem possivelmente faz ligações de hidrogénio e interações hidrofóbicas. Por sua vez, na região do grupo triazole protegido, encontra-se o resíduo Lys144 que possivelmente faz uma interação catião- π . O resíduo Phe31, próximo do grupo triazole, poderá interagir por empilhamento π (perpendicular) e, muito perto dessa zona encontra-se uma serina (Ser30), o que poderá originar ligações de hidrogénio com este grupo.

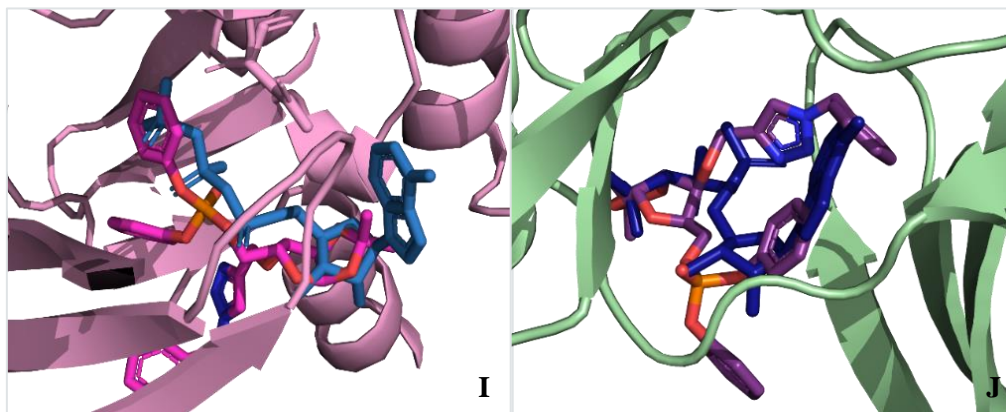


Figura 27: **I** – Sobreposição do composto C7 com o ATP (a azul), no local de ligação do ATP da enzima 4EOR. **J** – Sobreposição do composto C7 com o ATP (a azul escuro), no local de ligação com o ATP da enzima 6B8J.

De um modo geral, relativamente ao SET3, é possível concluir que os compostos contendo grupo fosfatos tiveram melhores resultados, sobretudo quando substituídos por grupos fenilo. Para além disso, a maior parte destes compostos também contém o grupo triazole protegido e parece não existir uma preferência relativamente às posições 1 e 2 da xilofuranose.

Deste modo, olhando para os resultados obtidos para todos os SETs, os compostos que parecem mais promissores são o A56, A58 e C7 (**figura 28**). Os compostos C9 e C1 também são promissores, apesar de não terem tido bons resultados no caso da enzima 4EOR. No entanto, também seria interessante testá-los, sobretudo porque entre o C7 e o C9 existem pequenas diferenças (o primeiro contem o grupo isopropilideno e o segundo é o respetivo anómero β). Entre o C7 e o C1 a diferença consiste nos substituintes do grupo fosfato, ou seja, no primeiro caso está substituído com fenilos e no segundo com etilos. Seria também interessante verificar se a nível biológico isso traria grandes diferenças a nível de biodisponibilidade. Destes compostos referidos, apenas o composto C7 e C1 se encontram sintetizados e caracterizados, correspondendo respetivamente ao composto **34** e **37** (**Anexos A1.23.** e **A1.26.**)

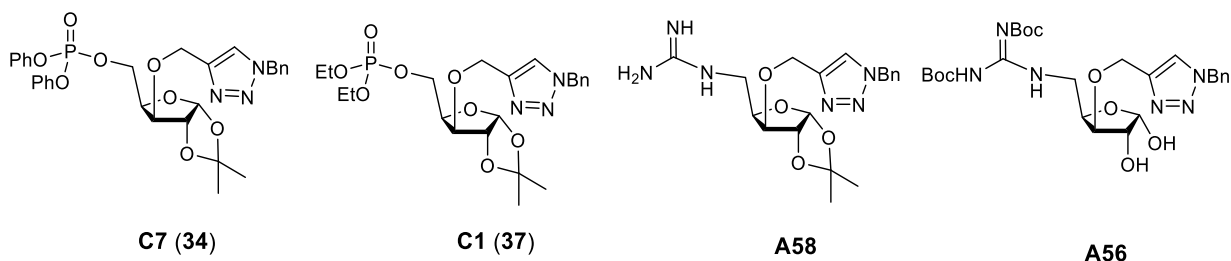


Figura 28: Estrutura dos compostos que obtiveram melhores resultados nos estudos de *docking* molecular.

Capítulo 3

Conclusão e Perspetivas futuras

3. Conclusão e Perspetivas futuras

De um modo geral, os compostos alvos foram sintetizados, tendo sido obtidos na maioria dos casos, com sucesso e com elevada pureza.

Os precursores desejados foram obtidos com sucesso, ou seja, os compostos **12**, **13** e **14**, contendo o grupo hidroxilo na posição 5 e os compostos **17**, **18**, **24** e **25**, as respetivas 5-azido furanoses. Porém, chegou-se à conclusão de que não é possível obter os compostos **24** e **25** através de tosilção e azidação a partir dos respetivos precursores (**13**, **14**), ao contrário dos compostos **17** e **18**, que foram obtidos com sucesso utilizando este método. Desta forma, foi necessário mudar a abordagem sintética, ou seja, introduzindo o grupo azida primeiro e depois o substituinte *O*-alilo ou *O*-propargilo na posição 3 da xilofuranose no passo a seguir. Apesar dos rendimentos terem sido mais baixos devido ao facto dos compostos intermediários **20** e **21** terem solubilidade considerável em água, foi possível obter os compostos desejados.

Foi possível observar que o composto **25** se degradava à temperatura ambiente, devido à presença de vários compostos nos espetros de RMN e nas TLCs. Verificou-se a tendência desse composto para sofrer ciclização intramolecular, uma vez que se obteve o respetivo triazole (**31**) por cicloadição 1,3 dipolar térmica, isto é, apenas por aumento de temperatura (110°C). Deste modo, conclui-se que o composto **25** é instável pois tem funcionalidades suscetíveis de reagir entre si na molécula (o grupo azida e a ligação tripla terminal), mesmo a temperatura ambiente, sendo possível obter um composto mais estável através de ciclização térmica.

No caso dos guanidino açúcares, foi possível obter os compostos **26** e **27** por dois métodos, ou utilizando a hidrogenação catalítica/guanidinilação ($\eta = 89\%$ e $\eta = 86\%$, respetivamente) ou usando a reação de Staudinger seguida de guanidinilação ($\eta = 79\%$ e $\eta = 81\%$, respetivamente). Quando se utilizou o primeiro método para obter o composto **30**, o grupo propargilo foi reduzido a propilo, tendo sido obtido o composto **28** ($\eta = 60\%$). Porém, pelo segundo método, foi possível obter os compostos **29** e **30** com rendimentos elevados ($\eta = 88\%$ e $\eta = 89\%$, respetivamente). Deste modo, é possível concluir que existem duas formas eficientes de obter guanidino açúcares e com rendimentos elevados, sendo que o segundo método testado é compatível com a presença de ligações triplas ou duplas, pois estas toleram as condições reacionais.

Os isonucleótidos contendo o grupo fosforamidato em C-5 (**40**), o grupo fosfato *O*-substituído com grupos fenilo (**34**) e no caso do composto **37**, *O*-substituído por grupos etilo, foram obtidos com sucesso. Porém, quando se tentou sintetizar o fosfonato análogo, existiram problemas na bromação da posição 5 e, quando se obteve o composto **41**, não foi possível convertê-lo no composto desejado utilizando a reação de Arbuzov. Esta reação, que se mostrou eficiente e

praticamente quantitativa noutros casos, não foi bem-sucedida com o derivado 5-bromo furanose **41**.

Também foi possível introduzir um grupo *O*-dodecilo na posição 5 do derivado de xilofuranose contendo um sistema *O*-(triazolil)metilo em C-3 (**38**) com sucesso ($\eta=95\%$), através de *O*-alquilação, conduzindo ao composto **42**.

Partido dos derivados (3-*O*-alil)furanos-5-il fosfato **32** e **35**, foi possível introduzir um grupo hidroxilo terminal na cadeia em C-3, utilizando o método descrito de hidroboração-oxidação, apesar de terem sido obtidos rendimentos baixos. Partindo dos álcoois primários obtidos **43** e **44**, não foi possível introduzir as bases azotadas utilizando o método de Mitsunobu, motivando a utilização de uma estratégia sintética alternativa para a obtenção dos isonucleótidos de purina ou pirimidina.

Os (bromometil)triazoles foram obtidos com melhores resultados para os derivados com o grupo *O*-dodecilo em C-3 (**47** e **48**), e foi possível obter os respetivos fosfonatos (**50** e **51**) de ambos os regioisómeros 1,4 e 1,5-dissubstituídos. Porém, é de notar que, no caso dos compostos com o grupo benzilo, também existe uma menor formação do regioisómero minoritário 1,5-dissubstituído. Deste modo, utilizando a reação de Arbuzov, os compostos **49**, **50** e **51** foram obtidos com sucesso ($\eta=98\%$, $\eta=96\%$ e $\eta=75\%$, respetivamente).

Relativamente aos (aminometil)triazoles, os rendimentos foram mais baixos, sobretudo no caso dos compostos contendo o grupo 3-*O*-benzilo, com um rendimento total de apenas 8% para os regioisómeros 1,4- e 1,5-dissubstituídos **52** e **53**. Para os compostos contendo o grupo 3-*O*-dodecilo, a conversão foi consideravelmente maior, tendo sido obtidos ambos os regioisómeros **54** e **55** com um rendimento total de 50%. É possível concluir que, ao contrário do que acontece no caso dos (bromometil)triazoles, em que se forma muito mais quantidade do regioisómero 1,4 do que do 1,5-dissubstituído, neste caso, os regioisómeros formam-se na proporção de 1:1. Isto possivelmente está relacionado com o facto de, como o bromo é um átomo com um grande raio atómico, cria maior impedimento estereoquímico à formação dos regioisómero 1,5-dissubstituídos.

Partindo dos derivados contendo um sistema (aminometil)triazole em C-5, foram obtidos os respetivos fosforamitados dos regioisómeros triazole 1,4-dissubstituídos **56** ($\eta=49\%$), e **57** ($\eta=52\%$), e o fosforamidato do derivado triazole 1,5-dissubstituído contendo o grupo 3-*O*-dodecilo (**58**, $\eta=52\%$).

Partindo dos [1-(furanos-5-il)triazol-4-il]metil fosfonatos **49** e **50**, foi possível obter os respetivos glicosil acetatos **59-60** por meio de remoção do grupo isopropilideno e posterior acetilação. Os análogos de nucleótidos de uracilo desejados, **61** e **62**, foram então obtidos através

de N-glicosilação com rendimentos modestos ($\eta=33\%$ e $\eta=15\%$), o que advém sobretudo da sua purificação, existindo o problema de ficarem retidos na coluna cromatográfica de sílica. Outras abordagens para a purificação deste tipo de compostos poderão ser implementadas futuramente para ultrapassar este problema.

Relativamente aos resultados obtidos através do *docking* molecular, foi possível concluir quais as características dos compostos que possibilitem que estes tenham mais afinidade para as enzimas em estudo. Para o SET1, é possível concluir que os compostos que tiveram melhores resultados continham grupos aromáticos, sobretudo o triazole substituído por um grupo benzilo. As restantes características estudadas como a guanidina protegida ou desprotegida e alterações nas posições 1 e 2 do anel de xilofuranose, de um modo geral, não parecem influenciar os resultados obtidos. Para o SET2, os compostos com melhores resultados continham o grupo benzilo na posição 3 e o grupo isopropilideno na posição 1 e 2, no entanto, não se verificou nenhuma preferência para o triazole 1,4- ou 1,5-dissubstituído. Foi também possível verificar que para o caso da enzima 6B8J, os compostos com melhores resultados continham todos bases azotadas, exceto o composto B10. Porém, é de notar que os valores de afinidade obtidos para os compostos deste SET são inferiores aos obtidos nos restantes SETs. Relativamente ao SET3, os compostos com melhores resultados continham grupos fosfato na sua grande maioria, sendo que existiu uma preferência pelos grupos fosfato substituídos por fenilo e também pelo grupo triazole contendo o grupo benzilo ligado em N-1. Desta forma, os compostos com substituintes aromáticos tiveram melhores resultados o que sugere que estes substituintes exploram a parte hidrofóbica das enzimas, com a vantagem de possibilitar o empilhamento- π com os resíduos de aminoácidos aromáticos.

No caso dos guanidino açúcares, era esperado que o grupo guanidina estabelecesse interações semelhantes às estabelecidas pelo grupo adenina do ATP, visto que é um potencial mimético de uma base azotada. No entanto, ao analisar-se a possível interação com as estruturas de CDK2 em estudo do composto com melhores resultados (A58), verificou-se que o grupo triazole protegido interage de forma semelhante ao da adenina, estabelecendo ligações de hidrogénio a partir de átomos de azoto da unidade triazole e interações hidrofóbicas com o grupo benzilo. Em alguns casos, como demonstrado na **figura 29**, verifica-se uma interação de hidrogénio entre N2 e o grupo NH de um resíduo leucina idêntico à interação essencial verificada entre a unidade adenina do ATP e a enzima. Também se verificou que o grupo guanidina estabelece várias ligações de hidrogénio e interações eletrostáticas com resíduos polares. Relativamente aos resultados obtidos para a estrutura da GSK3 β estudada, verificou-se que o composto tem uma orientação diferente, encontrando-se o sistema benziltriazole num local mais externo do local de ligação do ATP, estabelecendo interações hidrofóbicas e ligação de hidrogénio. A zona da molécula que se encontra mais para dentro da enzima é a unidade de furanose, sobretudo a parte do grupo

isopropilideno, estabelecendo interações hidrofóbicas com os resíduos apolares circundantes. Desta forma é possível concluir que o fragmento benziltriazole poderá ter mais afinidade para o local da enzima no qual o ciclo adenina do ATP interage, no caso das CDK2, do que o grupo guanidina, possivelmente por este local se encontrar próximo de uma região hidrofóbica, sendo assim favorecidas as interações hidrofóbicas com o grupo benzilo.

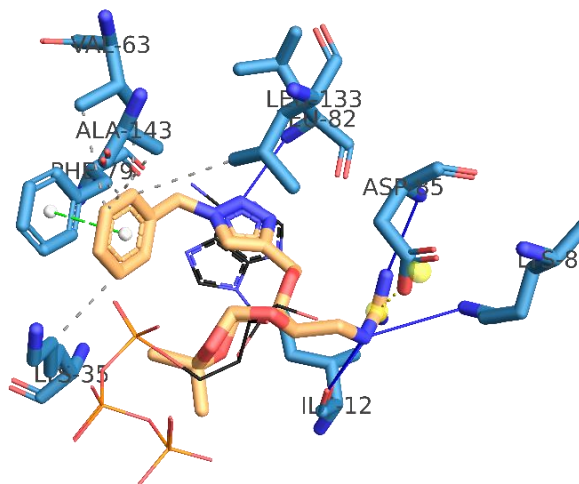


Figura 29: Resultados obtidos por docking molecular das possíveis interação entre o composto A58 e a enzima CDK2 (PDB: 4EOQ) e sobreposição com as estabelecidas pelo ATP

De um modo geral, foi possível concluir que houve uma coerência entre os resultados obtidos pelos estudos de *docking* molecular para a maioria dos casos. Deste modo, foi possível concluir que os compostos mais promissores são os compostos A56, A58 e C7, pois obtiveram melhores resultados em praticamente todos os casos estudados. Também seria interessante estudar os compostos C9 e C1, devido às pequenas diferenças que os distinguem do composto C7 e que poderão fazer grandes diferenças, ou não, a nível de biodisponibilidade e toxicidade.

Como perspectivas futuras, tendo em conta estes resultados de *docking* molecular, seria interessante sintetizar as guanidinas que obtiveram melhores *rankings* e efetuar testes biológicos com as enzimas estudadas. Visto que os composto C7 e C1 foram sintetizados, correspondendo respetivamente aos compostos **34** e **37**, seria também interessante sintetizar o composto de estrutura C9 e enviar esta série de compostos para testes biológicos, nomeadamente para ensaios de inibição das enzimas CDK2 e GSK3 β . Também seria importante estudar a sua biodisponibilidade e citotoxicidade.

O composto **31**, de estrutura tetracíclica contendo uma unidade de 1,5-triazole dissubstituída fundida, é um composto extremamente interessante e devido à sua rigidez, poderá ser mais seletivo para determinados alvos terapêuticos. Estas características motivam a síntese de derivados deste composto, sobretudo contendo o grupo fosforamidato, fosfonato e até mesmo contendo o grupo sulfonamida na posição anomérica, funcionando também como um possível mimético do grupo fosfato.

Relativamente aos resultados obtidos para as reações de hidroboração-oxidação, seria interessante explorar uma nova abordagem sintética. Uma via viável consistiria em proteger o grupo hidroxilo em C-5 com um grupo estável como o grupo tritilo e seguidamente proceder à introdução do grupo hidroxilo terminal na cadeia propílica em O-3, seguida da reação de Mitsunobu. Por fim, proceder-se-ia à remoção do grupo *O*-tritilo em C-5, para posterior fosforilação do álcool resultante.

Seria interessante explorar a síntese de compostos contendo um fragmento (hidroximetil)triazole, sendo este um análogo dos sistemas bromo e (aminometil)triazole, utilizando a ciclização térmica de 5-azido furanoses com o álcool propargílico, o que permitiria a posterior síntese dos respetivos (triazolil)metil fosfatos.

Apesar de os compostos do SET2, correspondentes aos compostos contendo um sistema metil triazole em C-5, terem demonstrado piores resultados do que os restantes nos estudos de *docking* molecular, apenas significa que para estas enzimas estudadas, estes compostos poderão ter menos afinidade que os restantes. No entanto, dado o perfil biológico conhecido dos análogos de nucleósidos e nucleótidos, como foi exemplificado na introdução deste trabalho, estes compostos poderão também ser estudados noutros alvos, quer por *docking*, quer em ensaios *in vivo*, bem como outras propriedades biológicas, além da inibição de enzimas, poderão ser estudadas. Para além disso, os compostos **49**, **50**, **51**, **61** e **62** poderão ser uma mais valia relativamente a casos de resistência por parte das células cancerígenas, devido ao facto de o grupo fosfonato ser um grupo estável e resistente à hidrólise e ao facto de terem grupos apolares que possivelmente possibilitarão a sua entrada nas células por difusão passiva.

O facto de os compostos C7, C9 e C1 terem tido tão bons resultados também motiva a exploração de novos análogos, sobretudo experimentar outras abordagens de forma a introduzir o grupo fosfonato.

Em suma, neste trabalho planearam-se e sintetizaram-se compostos de estruturas inovadoras e nunca antes reportadas, análogas de nucleósidos, de nucleótidos e de açúcares difosfato, contendo grupos neutros, potencialmente miméticos e relativamente estáveis dos sistemas mono e difosfato. As estruturas destas moléculas motivam futuros estudos da sua atividade biológica, nomeadamente de inibição de enzimas dependentes de nucleótidos, como as aqui focadas, bem como de outras propriedades de interesse terapêutico, tais como anticancerígenas ou antivirais.

Capítulo 4

Procedimento e caracterização

4. Parte experimental

A parte experimental para a síntese e para o *docking* molecular estão no **anexo A1** e **anexo B1**, respetivamente.

4.1. Síntese dos compostos

4.1.1. Instrumentação

Para pesagem dos compostos, foi utilizada uma balança digital analítica de marca KERN ALJ, modelo 220-4, com uma precisão 0.001 g. Também foi utilizada a balança digital analítica da marca OHAUS, Pioneer™ Balances, modelo PA114, com uma precisão de 0.0001g.

As soluções foram concentradas com recurso a evaporadores rotativos da marca Büchi (modelos Rotavapor® R111 e modelo Rotavapor® R200), à temperatura de 40°C e em vários graus de pressão reduzida, definidos segundo o solvente ou mistura de solventes utilizados.

Para as reações de *N*-glicosilação foi utilizado um aparelho de micro-ondas CEM DISCOVER® SP w/ Activent (909155).

Quando necessário foi utilizado um banho de ultra-sons VWR™ Ultrasonic Cleaner para promover a dissolução dos compostos.

A caracterização estrutural dos compostos realizada por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi efetuada num aparelho BRUKER Avance 400, no qual foram obtidos os espectros de ¹H RMN, ¹³C RMN e ³¹P RMN a uma frequência de 400,13 MHz, 100,62 MHz e 162 MHz, respetivamente, à temperatura de 25°C. Os compostos dissolvidos num solvente deuterado apropriado foram sujeitos a experiências de ¹H-RMN, ¹³C-RMN, ³¹P-RMN, COSY, HSQC e HMBC. Utilizou-se como solvente deuterado para preparação das amostras clorofórmio-d (CDCl₃), contendo tetrametilsilano, TMS como padrão interno, ou metanol deuterado CD₃OD. Nas experiências de ¹H-RMN em CDCl₃ usou-se o pico do TMS como referência (0 ppm) e no caso dos espectros realizados em CD₃OD utilizou-se como referência o sinal residual do solvente (3.31 ppm, quintupeto). Nos casos em que o CDCl₃ usando não continha TMS, a calibração foi feita com base no pico residual correspondente ao solvente não deuterado. No caso das experiências de ¹³C, os espectros foram calibrados a partir dos sinais do solvente deuterado usado (77.16 ppm, tripleto, no caso do CDCl₃ e 49 ppm, no caso de CD₃OD, septeto). Os valores de desvio químico, δ, são expressos em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hz. A descrição dos espectros dos compostos segue a seguinte ordem:

desvio químico (tipo de sinal, constantes de acoplamento, atribuição do sinal, integração).

As rotações específicas foram medidas usando o polarímetro Perkin Elmer 343, a uma temperatura de 20 °C, com uma concentração de 10 mg/ml e com um percurso óptico de 1 cm.

As análises de massa de alta resolução (HRMS) foram realizadas no Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa (IST), pela Doutora Conceição Oliveira. Os espectros foram adquiridos com um espectrómetro de massa High Resolution QqTOF Impact II equipada com uma fonte de iões ESI da Bruker Daltonics. Os espectros foram registados no modo positivo.

4.1.2. Técnicas de separação e purificação

O acompanhamento das reações foi realizado por cromatografia em camada fina (TLC) em placas de sílica gel (Ref. 60 F254, Merck) com deteção por luz UV e revelação promovida por uma solução de ácido sulfúrico e metanol (10%), seguida de aquecimento com uma pistola de ar quente. Quando necessário foi efetuada a purificação do composto, realizada por cromatografia em coluna, sendo a fase estacionária constituída por sílica gel 60 (0,040-0,063 mm, Ref. Merck 9385).

4.1.3. Procedimento geral para a introdução dos substituintes na posição 3 do açúcar.

O composto **1** (1,2:5,6-di-*O*-isopropilideno- α -D-glucofuranose) foi dissolvido em DMF (c~0,2), tendo sido adicionados 1,2 equivalentes de brometo de dodecilo (para obter o composto **2**); brometo de alilo (para obter o composto **3**); ou brometo de propargilo (para obter o composto **4**). A mistura reacional foi arrefecida a 0°C e posteriormente foram adicionados 1,2 equivalentes de hidreto de sódio, tendo sido deixada à temperatura ambiente, sob atmosfera inerte, durante a noite. O término da reação foi verificado por TLC. A mistura reacional foi submetida a uma extração utilizando éter dietílico e água destilada. A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio anidro e após filtração, o solvente foi evaporado no evaporador rotativo.

4.1.3.1. Síntese dos compostos 2, 3 e 4.

Estes compostos foram sintetizados de acordo com o procedimento descrito em **4.1.3.**, partindo de 3g (11,5mmol) de DAG, e foram utilizados sem purificação intermédia no passo seguinte da remoção seletiva do grupo 5,6-*O*-isopropilideno.

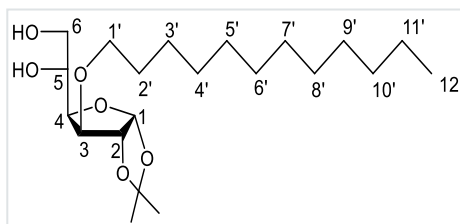
4.1.4. Procedimento geral para a desproteção seletiva do grupo isopropilideno

Dissolveu-se **2**, **3** ou **4** numa solução de 76% de ácido acético em água (c~0,2), sendo a mistura reacional deixada a agitar à temperatura ambiente. Após o término da reação, o ácido acético e água foram evaporados no evaporador rotativo, com auxílio de tolueno. O resíduo obtido foi sujeito a purificação utilizando uma cromatografia em coluna com os eluentes adequados.

4.1.4.1. Síntese do composto **5** – 3-O-dodecil-1,2-O-isopropilideno- α -D-glucofuranose

Este composto foi sintetizado de acordo com o procedimento descrito em **4.1.4.**, partindo do composto **1** (3g; 11,5mmol) e verificou-se o término da reação após 5dias. O eluente para a coluna de cromatografia foi 5:1 Hex/AcOEt. Foi obtido com um rendimento global de 68% (2 etapas), sob a forma de um óleo amarelado.

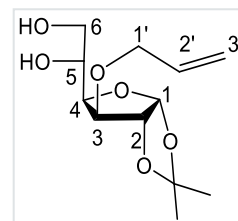
$R_f = 0,68$ (2:1 Hex/AcOEt); $[\alpha]_D^{20} = -27$ (c=1; CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5,94$ (d, $J_{H1, H2} = 3,86$ Hz, H-1, 1H), $4,58$ (d, $J_{H2, H1} = 3,80$ Hz, H-2, 1H), $4,15$ (dd, $J_{H4, H5} = 7,36$ Hz, $J_{H4, H3} = 3,42$ Hz, H-4, 1H), $4,07$ - $4,01$ (m, H-5, 1H), $3,99$ (d, $J_{H3, H4} = 3,72$ Hz, H-3, 1H), $3,85$ (dd, sistema ABX, $J_{H6a, H6b} = 11,34$ Hz, $J_{H6a, H5} = 3,64$ Hz, H-6a, 1H), $3,74$ (dd, sistema ABX, $J_{H6a, H6b} = 11,56$ Hz, $J_{H6a, H5} = 5,81$ Hz, H-6b, 1H), $3,66$ (dt, $J_{H1'a, H1'b} = 15,67$ Hz, H-1'a, 1H), $3,50$ (dt, $J_{H1'b, H2'a} = J_{H1'a, H2'a} = 6,55$ Hz, $6,57$ Hz, H-1'b, 1H), $1,63$ - $1,55$ (m, H-2', 2H), $1,50$ (s, CH_3 , i-Prop, 3H), $1,37$ - $1,24$ (m, CH_3 , i-Prop, CH_2 -3',4',5',6',7',8',9',10',11', 21H), $0,89$ (t, $J_{H12'', H11'a} = J_{H12'', H11'b} = 6,16$ Hz, 3H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 111,86$ (Cq, i-Prop), $104,90$ (C-1), $82,05$ (C-2), $83,03$ (C-3), $79,80$ (C-4), $70,37$ (C-1'), $69,75$ (C-5), $64,38$ (C-6), $31,92$; $29,73$; $29,65$; $29,63$; $29,60$; $29,54$; $29,39$; $29,35$; $26,09$, $22,64$ (C-2', 3',4',5',6',7',8',9',10',11'), $26,26$; $26,85$ (2CH_3 , i-Prop) $14,17$ (C-12') ppm. **HRMS**: calcd. para $\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{O}_6$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 389.2898; experimental 389.2899.



4.1.4.2. Síntese do composto **6** - 3-O-alil-1,2-O-isopropilideno- α -D-glucofuranose

Este composto foi sintetizado de acordo com o procedimento descrito em **4.1.4.**, partindo do composto **1** (3g; 11,5mmol) e verificou-se o término da reação após 24h. O eluente para a coluna de cromatografia foi 4:1 Hex/AcOEt. Foi obtido com um rendimento de 86%, sob a forma de um óleo amarelado.

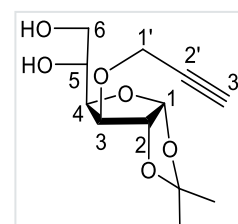
$R_f = 0,21$ (2:1, Hex/AcOEt); $[\alpha]_D^{20} = -31$ ($c=1$; CH_2Cl_2); **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5,96\text{-}5,87$ (m, H-1, H-2', $J_{H1,H2} = 3,88$ Hz, 2H), 5,33 (dq, $J_{H3'a,H3'b} = J_{H3'b,H1'a} = J_{H3'a,H1'b} = 1,71$ Hz, $J_{H3'a,H2'} = 15,67$ Hz, H-3'a, 1H), 5,24 (dq, $J_{H3'a,H3'b} = J_{H3'b,H1'a} = J_{H3'a,H1'b} = 1,71$ Hz, $J_{H3'b,H2'} = 10,44$ Hz, H-3'b, 1H), 4,59 (d, $J_{H2,H1} = 3,77$ Hz, H-2, 1H), 4,20 (ddt, $J_{H1'a,H2'} = 5,5$ Hz, $J_{H1'a,H1'b} = 12,91$ Hz, H-1a', 1H), 4,13 (dd, $J_{H4,H3} = 3,4$ Hz, $J_{H4,H5} = 7,94$ Hz, H-4, 1H), 4,10-4,05 (m, H-1b', 1H), 4,06 (d, $J_{H3,H4} = 3,33$ Hz, H-3, 1H), 4,05-4,0 (m, H-5), 3,83 (dd, Parte A do sistema ABX, $J_{H5,H6a} = 3,59$ Hz, H-6a, 1H), 3,74 (dd, Parte B do sistema ABX, $J_{H6b,H6a} = 11,35$ Hz, H-6b 1H), 1,50 (s, CH_3 , i-Prop, 3H), 1,33 (s, CH_3 , i-Prop, 3H) ppm. **$^{13}\text{C NMR}$** (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 133,69$ (C-2'), 118,11 (C-3'), 111,17 (Cq, i-Prop), 105,05 (C-1), 82,11 (C-2), 82,03 (C-3), 79,84 (C-4), 71,08 (C-1'), 69,29 (C-5), 64,35 (C-6), 26,70 (C, i-Prop), 26,19 (C, i-Prop) ppm. **HRMS**: calcd. para $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_6$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 283.1152; experimental 283.1156. calcd. para $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_6$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 261.1333; experimental 261.1335.



4.1.4.3. Síntese do composto 7 - 1,2-O-isopropilideno-3-O-propargil-α-D-glucofuranose

Este composto foi sintetizado de acordo com o procedimento descrito em 4.1.4., partindo do composto 1 (3g; 11,5mmol) e verificou-se o término da reação após 24h. O eluente para a coluna de cromatografia foi 4:1 Hex/AcOEt. Foi obtido com um rendimento de 96%, sob a forma de um óleo amarelado.

$R_f = 0,14$ (3:1, Hex/AcOEt); $[\alpha]_D^{20} = -35$ ($c=1$; CH_2Cl_2); **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5,93$ (d, $J_{H1,H2} = 3,20$ Hz, H-1, 1H), 5,32 (s, OH, 1H), 4,63 (d, $J_{H2,H1} = 3,18$ Hz, H-2, 1H), 4,40-4,34 (m, H-1'a, 1H), 4,29-4,23 (m, H-1'b, H-3, 2H), 4,21-4,16 (m, H-4, 1H), 4,03-3,97 (m, H-5, 1H), 3,87 (ddd, $J_{H6a,H6b} = 11,56$ Hz, $J_{H6a,H5} = 3,16$ Hz, $J_{H6a,OH} = 1,54$ Hz, H-6a, 1H), 3,75 (ddd, $J_{H6b,H5} = 5,50$ Hz, $J_{H6b,OH} = 1,13$ Hz, H-6b', 1H), 2,55 (s, H-3', 1H), 1,51 (s, CH_3 , i-Prop, 3H), 1,33 (s, CH_3 , i-Prop, 3H) ppm. **$^{13}\text{C NMR}$** (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 111,94$ (Cq, i-Prop), 105,20 (C-1), 82,06 (C-2), 81,51 (C-3), 79,78 (C-4), 79,09 (C-2'), 75,55 (C-3'), 69,03 (C-5), 64,28 (C-6), 57,55 (C-1'), 26,71, 26,21 (2 CH_3 , i-Prop) ppm. **HRMS**: calcd. para $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_6$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 281.0996; experimental 281.1003. calcd. para $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_6$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 259.1176; experimental 259.1176.



4.1.4.4. Síntese do composto 19 - 1,2-*O*-isopropilideno- α -D-glucofuranose

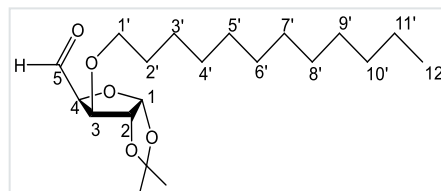
Este composto foi sintetizado de acordo com o procedimento descrito em 4.1.4., partindo do composto **1** (3g; 11,5mmol) e verificou-se o término da reação após 24h. Não é necessário efetuar uma coluna de cromatografia, visto que, por filtração a vácuo com lavagem com éter dietílico, é possível remover as impurezas, tendo sido um sólido branco obtido com rendimento de 82%.

4.1.5. Procedimento geral para a clivagem oxidativa

O composto foi dissolvido numa solução de THF/H₂O (3:1) e a mistura reacional foi colocada a 0°C, tendo sido adicionados 1,5equivalente de periodato de sódio (NaIO₄), tendo sido deixada sob agitação durante 4h, à temperatura ambiente. Após o término da reação, que foi verificado por TLC, filtrou-se com celite, de forma a remover a maior parte do periodato de sódio. Foi feita uma extração com AcOEt/H₂O, as fases orgânicas combinadas foram secadas com sulfato de magnésio anidro e após filtração e o solvente foi evaporado no evaporador rotativo.

4.1.5.1. Síntese do composto 8 – 3-*O*-Dodecil-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilopentodialdo-1,4-furanose

Este composto foi sintetizado de acordo com o procedimento descrito em 4.1.5., partindo do composto **5** (1,8g; 4,63mmol) tendo sido obtido com uma pureza satisfatória (η =88%).

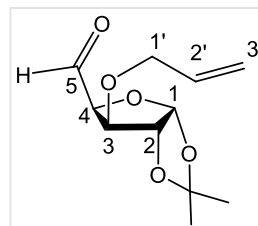


R_f = 0,70 (2:1, Hex/AcOEt); $[\alpha]_D^{20}$ = -32 ($c=1$; CH₂Cl₂); **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ = 9,67 (s, H-5, 1H), 6,13 (d, $J_{H1,H2}$ = 3,27 Hz, H-1, 1H), 4,62 (d, $J_{H4,H3}$ = 3,17 Hz, H-4, 1H), 4,58-4,54 (m, H-2, 1H), 4,22 (d, $J_{H3,H2}$ = 3,41 Hz, H-3, 1H), 3,55 (dt, $J_{H1'a,H-1'b}$ =15,70 Hz, H-1'a, 1H), 3,39 (dt, $J_{H1'a,H2'}=J_{H-1'b,H2'}=6,61$ Hz, H-1'b, 1H), 1,50 (s, CH₃, i-Prop, 3H), 1,37-1,24 (m, CH₃-i-Prop, CH₂-3',4',5',6',7',8',9',10',11', 21H), 0,90 (t, $J_{H-12',H-11'a} = J_{H-12',H-11'b} = 6,54$ Hz, 3H) ppm. **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ = 200,17 (C-5), 112,45 (Cq- i-Prop), 106,21 (C-1), 84,58 (C-2, C-3), 82,19 (C-4), 71,02 (C-1') 31, 93; 29,66; 29,64; 29,59; 29,53; 29,44; 29,36; 29,33; 25,80 (C-2', 3',4',5',6',7',8',9',10',11'), 27,03; 26,38 (2CH₃, i-Prop), 14,10 (C-12') ppm. **HRMS**: calcd. para C₂₀H₃₆O₅ [M + H]⁺ 357.2636; experimental 357.2636.

4.1.5.2. Síntese do composto 9 - 3-*O*-alil-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilopentodialdo-1,4-furanose

Este composto foi sintetizado de acordo com o procedimento descrito em **4.1.5.**, partindo do composto **6** (0,5g; 1,9mmol), tendo sido utilizado para o passo seguinte da redução do aldeído ($\eta=69\%$).

$R_f = 0,78$ (2:1, Hex/AcOEt); $[\alpha]_D^{20} = -45$ ($c=1$; CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 9,67$ (s, H-5, 1H), 6,12 (s, H-1, 1H), 5,84-5,74 (m, H-2', 1H), 5,27-5,20 (m, H-3', 2H), 4,62 (s, H-2, 1H), 4,57 (s, H-4, 1H), 4,30 (s, H-3, 1H), 4,10-4,06 (m, H1'a, 1H), 3,98-3,93 (m, H1'b, 1H), 1,48 (s, CH_3 , i-Prop, 3H), 1,34 (s, CH_3 , i-Prop, 3H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 200,10$ (C-5), 133,23 (C-2'), 118,26 (C-3'), 112,56 (Cq, i-Prop), 106,18 (C-1), 84,57 (C-4), 83, 59 (C-3), 82, 29 (C-2), 71, 36 (C-1'), 26,98 (C, i-Prop), 26,35 (C, i-Prop) ppm. **HRMS**: calcd. para $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_5$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 251.0890; experimental 251.0895.



4.1.5.3. Síntese do composto **10** - 1,2-*O*-isopropilideno-3-*O*-propargil- α -D-xilo-pentodialdo-1,4-furanose

Este composto foi sintetizado de acordo com o procedimento descrito em **4.1.5.**, partindo do composto **7**, tendo sido utilizado sem purificação intermédia, no passo seguinte da redução do aldeído.

4.1.5.4. Síntese do composto **20** - 1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilo-pentodialdo-1,4-furanose

Este composto foi sintetizado, partindo do composto **19**, de acordo com o procedimento descrito em **4.1.5**. Porém, o tratamento da reação não pode ser feito pois o composto é solúvel em água, tendo sido removida toda a água no evaporador rotativo, com ajuda de tolueno e efetuadas várias filtrações com celite e AcOEt.

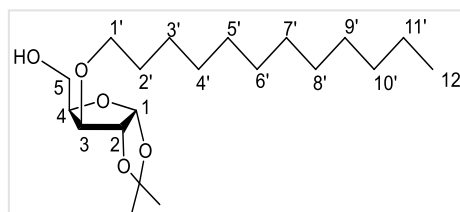
4.1.6. Procedimento geral para a redução do aldeído

O composto foi dissolvido numa solução de EtOH/ H_2O (2:1), tendo sido a mistura reacional arrefecida a 0°C , de forma a adicionar 1,5equivalentes de borohidreto de sódio, lentamente. A solução foi deixada sob agitação, durante 1h. Após o término da reação, foi efetuada uma extração com AcOEt/ H_2O e as fases orgânicas foram lavadas com uma solução de NaCl saturada. De seguida, as fases orgânicas foram secas com sulfato de magnésio anidro e após filtração, o AcOEt foi evaporado.

4.1.6.1. Síntese do composto 12 - 3-O-dodecil-1,2-O-isopropilideno- α -D-xilofuranose

Este composto foi sintetizado de acordo com o procedimento descrito em 4.1.6., partindo do composto 8 (1,29g; 3,6mmol), e foi obtido com um rendimento de 87%, sob a forma de um óleo incolor.

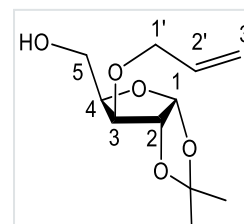
$R_f = 0,68$ (2:1, Hex/AcOEt); $[\alpha]_D^{20} = -30$ (c=1; CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5,96$ (d, $J_{H1, H2} = \text{Hz}$, H-1, 1H), 4,56 (d, $J_{H2, H1} = \text{Hz}$, H-2, 1H), 4,27 (d, $J_{H4, H3} = 3,42$ Hz, H-4, 1H), 3,97-3,84 (m, H-3, H-5a,b, 3H), 3,61 (ddd, $J_{H1'a, H1'b} = 15,67$ Hz, $J_{H1''a, H2''a} = 6,55$ Hz, $J_{H1'a, H2''b} = 1,21$ Hz, H-1'a, 1H), 3,43 (ddd, $J_{H1'b, H2'a} = 6,57$ Hz, $J_{H1'b, H2'b} = 1,05$ Hz, H-1'b, 1H), 1,58-1,52 (m, CH_2 -2', 2H), 1,48 (s, CH_3 , i-Prop, 3H), 1,32-1,25 (m, CH_3 , i-Prop, CH_2 -3',4',5',6',7',8',9',10',11', 21H), 0,87 (t, $J_{H-12'', H-11'a} = J_{H-12'', H-11'b} = 6,16$ Hz, 3H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 111,62$ (Cq, i-Prop), 105,03 (C-1), 84,08 (C-3), 82,35 (C-2), 79,93 (C-4), 70,48 (C-1'), 61,02 (C-5), 31,89; 29,62; 29,57; 29,35; 29,33; 26,01; 22,67 (C-2',3',4',5',6',7',8',9',10',11'), 26,79; 26,27 (2 CH_3 , i-Prop), 14,11 (C-12') ppm. **HRMS**: calcd. para $\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{O}_5$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 359.2792; experimental 359.2802.



4.1.6.2. Síntese do composto 13 - 3-O-alil-1,2-O-isopropilideno- α -D-xilofuranose

Este composto foi sintetizado de acordo com o procedimento descrito em 4.1.6., partindo do composto 9 (0,3g; 1,3mmol), e foi obtido com um rendimento de 58%, sob a forma de um óleo amarelado.

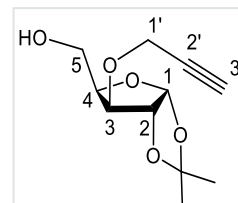
$R_f = 0,42$ (2:1, Hex/AcOEt); $[\alpha]_D^{20} = -36$ (c=1; CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5,98$ (s, H-1, 1H), 5,83 (m, H-2', 1H), 5,31 (dq, $J_{H3'a, H3'b} = J_{H3'a, H1'a} = J_{H3'a, H1'b} = 1,42$ Hz, $J_{H3'a, H2'} = 15,58$ Hz, H-3'a, 1H), 5,24 (dq, $J_{H3'a, H3'b} = J_{H3'b, H1'a} = J_{H3'b, H1'b} = 1,45$ Hz, $J_{H3'b, H2'} = 10,43$ Hz, H-3'b, 1H), 4,59 (s, H-2, 1H), 4,31 (s, H-3, 1H), 4,19-4,15 (m, H-1'a, 1H), 4,02-3,87 (m, H-4, H-1'b, , H-5a, H-5b, 4H), 1,50 (s, CH_3 , i-Prop, 3H), 1,33 (s, CH_3 , i-Prop, 3H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 133,54$ (C-2'), 118,06 (C-3'), 111,72 (Cq, i-Prop), 105,02 (C-1), 82,96 (C-4), 82,94 (C-2), 82,49 (C-3), 70,91 (C-1'), 60,05 (C-5), 26,80 (C, i-Prop), 26,29 (C, i-Prop) ppm. **HRMS**: calcd. para $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_5$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 231.1227; experimental 231.1235. calcd. para $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_5$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 253.1046; experimental 253.1058.



4.1.6.3. Síntese do composto 14 - 3-*O*-propargil-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranose

Este composto foi sintetizado de acordo com o procedimento descrito em 4.1.6., partindo do composto **10** (3g; 11,6mmol) e foi obtido com um rendimento de 57%, sob a forma de um óleo amarelado.

$R_f = 0,51$ (2:1, Hex/AcOEt); $[\alpha]_D^{20} = -62$ ($c=1$; CH_2Cl_2). **^1H NMR** (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5,87$ (d, $J_{\text{H1,H2}}=3,42$ Hz, H-1, 1H), 4,56 (d, $J_{\text{H1,H2}}=3,14$ Hz, H-1, 1H), 4,26-4,23 (m, H-4, 1H), 4,23-4,12 (m, H-1', 1H), 4,09 (s, H-3, 1H), 3,83-3,73 (m, H-5a, H-5b, 2H), 2,50 (s, H-3', 1H), 1,43 (s, CH_3 , i-Prop, 3H), 1,25 (s, CH_3 , i-Prop, 3H) ppm. **^{13}C NMR** (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 118,87$ (Cq, i-Prop), 105,05 (C-1), 82,30 (C-2), 82,05 (C-3), 80,02 (C-4), 78,85 (C-3'), 75,46 (C-1'), 60,58 (C-5), 60,42 (C-2'), 57,38 (C-1'), 26,78, 26,29 (2CH_3 , i-Prop) ppm. **HRMS**: calcd. para $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_5$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 251.0890; experimental 251.0895.



4.1.6.4. Síntese do composto 21 - 1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranose

Este composto foi sintetizado partindo do composto **20** e de acordo com o procedimento descrito em 4.1.6., exceto a parte do tratamento da reação, pois o composto é solúvel em água. Deste modo, foi evaporada toda a água, foram feitas várias filtrações com AcOEt e por fim, uma coluna de cromatografia (7:1, AcOEt: MeOH), tendo sido obtido o composto com um rendimento de 40% (óleo amarelo).

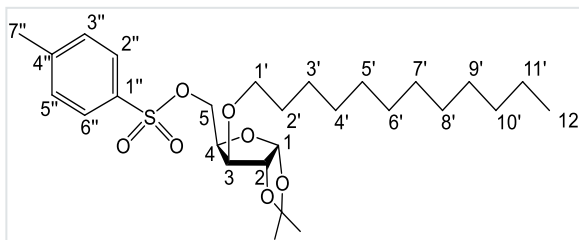
4.1.7. Procedimento geral para a tosilação

O composto foi dissolvido em piridina ($c \sim 0,2$), tendo sido adicionado posteriormente, 2 equivalentes de cloreto de tosilo. A mistura reacional ficou sob agitação e a atmosfera inerte (N_2), durante a noite. A reação foi acompanhada por TLC e após o seu término, a piridina foi evaporada utilizando tolueno de forma a obter uma solução azeotrópica.

4.1.7.1. Síntese dos compostos 15 (3-*O*-benzil-1,2-*O*-isopropilideno-5-tosil- α -D-xilofuranose), 16 (-3-*O*-dodecil-1,2-*O*-isopropilideno-5-tosil- α -D-xilofuranose) e 22 (1,2-*O*-isopropilideno-5-tosil- α -D-xilofuranose)

Estes compostos foram sintetizados de acordo com o procedimento descrito em 4.1.7., partindo respectivamente dos compostos **11** (0,7846g; 2,79mmol), **12** (0,8g; 2mmol) e **21** (1,7g; 8,9mmol), tendo sido utilizados para o passo seguinte (da azidação). O composto **16** foi obtido com um rendimento de 91% (0,92g; 2mmol), sob a forma de um sólido branco, após uma coluna de cromatografia utilizando como eluente 6:1 Hex/AcOEt.

$R_f = 0,41$ (4:1, Hex/AcOEt); p.f. = 50,5°C-52,7°C; $[\alpha]_D^{20} = -22$ (c=1; CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7,83$ (d, $J_{H2'',H3''} = J_{H6'',H5''} = 8,02$ Hz, H-2'', H-6'', 2H), 7,56 (d, $J_{H3'',H2''} = J_{H5'',H6''} = 8,02$ Hz, H-3'', H-5'', 2H), 5,86 (d, $J_{H1,H2} = 3,79$ Hz, H-1, 1H), 4,52 (d, $J_{H4,H3} = 3,17$ Hz, H-4, 1H), 4,38-4,34 (m, H-3, 1H), 4,33-4,27 (m, H-5a, 1H), 4,18-4,12 (m, H-5b, 1H), 3,83 (d, $J_{H2,H1} = 3,24$ Hz, H-2, 1H), 3,55 (dt, $J_{H1'a,H1'b} = 15,78$ Hz, H-1'a, 1H), 3,36 (dt, $J_{H1'b,H2'} = J_{H1'a,H2'} = 6,52$ Hz, H-1'b, 1H), 2,46 (s, CH₃-7'', 3H), 1,64-1,44 (m, 2CH₃, i-Prop, 6H), 1,34-1,22 (m, CH₂-2',3',4',5',6',7',8',9',10',11', 22H), 0,90 t, $J_{H12',H11'a} = J_{H12',H11'b} = 6,57$ Hz, 3H) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 149,99$ (C-1''), 132,70 (C-4''), 111,75 (Cq, i-Prop), 144,86 (C-1'), 129,91 (C-2'',6''), 128,04 (C-3'',5''), 104,93 (C-1), 82,06 (C-4), 81,89 (C-2), 77,58 (C-3), 70,73 (C-1'), 67,05 (C-5), 21,67 (C-7'), 31,94; 29,69; 29,66; 29,64; 29,59; 29,57; 29,43; 29,38; 26,82; 26,72 (C-2',3',4',5',6',7',8',9',10') 26,28; 25,99 (2CH₃, i-Prop), 13,91 (C-12'). HRMS: calcd. para C₁₁H₁₈O₅ [M + H]⁺ 513.2881; experimental 513.2886.



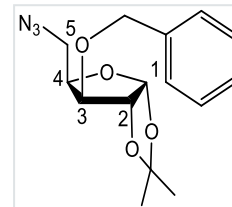
4.1.8. Procedimento geral para a azidação

O composto foi dissolvido em DMF (c~0,2), tendo sido posteriormente adicionado 3equivalentes de azida de sódio, sob atmosfera inerte, tendo sido a mistura reacional deixada durante a noite sob agitação e a uma temperatura de 80°C. O fim da reação foi confirmado por TLC. A mistura reacional foi submetida a uma lavagem com éter dietílico e água destilada, sendo posteriormente secada com sulfato de magnésio anidro e concentrada.

4.1.8.1. Síntese do composto 17 – 5-azido-3-O-benzil-5-desoxi-1,2-O-isopropilideno- α -D-xilofuranose

Este composto foi sintetizado de acordo com o procedimento descrito em **4.1.8.**, fazendo reagir diretamente o crude contendo **15**, sem purificação intermédia. O eluente para a coluna de cromatografia foi 6:1 Hex/AcOEt, tendo sido obtido um óleo amarelado com um rendimento de 80% (2 etapas).

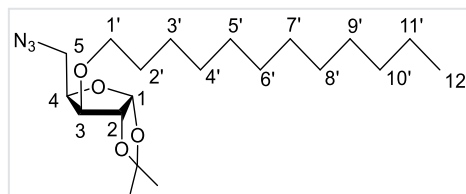
$R_f = 0,53$ (5:1, Hex/AcOEt); $[\alpha]_D^{20} = -36$ (c=1; CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7,41-7,28$ (m, 5H, Bn), 6,70 (d, $J_{H1, H2} = 3,53$ Hz, H-1, 1H), 4,72 (d, Parte A do sistema AB, $J_{Ha, Hb} = 11,5$ Hz, CH₂, Bn, 1H), 4,66 (d, $J_{H2, H1} = 3,79$ Hz, H-2, 1H), 4,55 (d, Parte B do sistema AB, CH₂, Bn, 1H), 3,98 (d, $J_{H3, H4} = 3,48$ Hz, H-3, 1H), 4,33 (td, $J_{H4, H5a, b} = 6,63$ Hz, $J_{H4, H3} = 3,38$ Hz, H-4, 1H), 3,62 (dd, Parte A do sistema ABX, $J_{H5a, H4} = 6,41$ Hz, H-5a, 1H), 3,51 (dd, parte B do sistema ABX, $J_{H5a, H5b} = 12,35$ Hz, H-5b), 1,51 (s, CH₃, i-Prop, 3H), 1,35 (s, CH₃ i-Prop, 3H) ppm.



4.1.8.2. Síntese do composto 18 - 5-azido-3-O-dodecil-5-desoxi-1,2-O-isopropilideno-α-D-xilofuranose

Este composto foi sintetizado de acordo com o procedimento descrito em **4.1.8.**, partindo do composto **16** (0,73g; 1,9mmol). O eluente para a coluna de cromatografia foi 9:1 Hex/AcOEt e o composto foi obtido com um rendimento de 78% (óleo incolor).

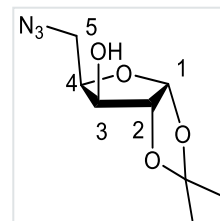
$R_f = 0,52$ (6:1, Hex/AcOEt); $[\alpha]_D^{20} = -26$ (c=1; CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 5,99$ (d, $J_{H1, H2} = 3,77$ Hz, H-1, 1H), 4,58 (d, $J_{H2, H1} = 3,77$ Hz, H-2, 1H), 4,30 (td, $J_{H4, H5a, b} = 6,74$ Hz, $J_{H4, H3} = 3,33$ Hz, H-4, 1H), 3,83 (d, $J_{H3, H4} = 3,35$ Hz, H-3, 1H), 3,63 (dt, $J_{H1'a, H1'b} = 15,62$ Hz, H-1'a, 1H), 3,53 (d, $J_{H5a, b, H4} = 6,75$ Hz, H-5, 2H), 3,42 (dt, $J_{H1b, H2'} = J_{H1'a, H2'} = 6,49$ Hz, H-1'b, 1H), 1,59-1,54 (m, H-2', 2H), 1,51 (s, CH₃, i-Prop, 3H), 1,34 (s, CH₃, i-Prop, 3H), 1,33-1,25 (m, H-2', 3', 4', 5', 6', 7', 8', 9', 10', 11', 22H), 0,89 (t, $J_{H12'', H11'a} = J_{H12'', H11'b} = 6,57$ Hz, H-12', 3H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 111,82$ (Cq, i-Prop), 105,09 (C-1), 82,05 (C-2, C-3), 78,86 (C-4), 70,34 (C-1'), 48,90 (C-5), 31,93; 29,66; 29,64; 29,61; 29,57; 29,41; 26,36; 26,09; 22,70 (C-2', 3', 4', 5', 6', 7', 8', 9', 10', 11'), 26,83; 26,26 (2CH₃, i-Prop), 14,14 (C-12') ppm. HRMS: calcd. para C₂₀H₃₇N₃O₄ [M + Na]⁺ 406.2676; experimental 406.2674.



4.1.8.3. Síntese do composto 23 - 5-azido-5-desoxi-1,2-O-isopropilideno- α-D-xilofuranose

Este composto foi sintetizado de acordo com o procedimento descrito em **4.1.8.**, partindo do composto **22** (1g; 2,9mmol). O eluente para a coluna de cromatografia foi 3:1 Hex/AcOEt e o composto foi obtido com um rendimento de 30% (óleo amarelo).

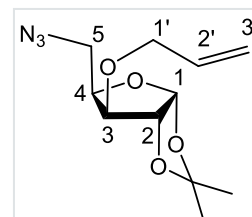
$R_f=0,49$ (1:1, Hex/AcOEt); $[\alpha]_D^{20} = -33$ (c=1; CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5,99$ (d, $J_{H1,H2}=4,23$ Hz, H-1, 1H), 4,55 (d, , $J_{H2,H1}=3,80$ Hz, H-2, 1H), 4,33-4,27(m, H-4, H-3, 2H), 3,69-3,60 (m, H-5a, H-5b, 2H), 1,53 (s, CH_3 , i-Prop, 3H), 1,34 (s, CH_3 , i-Prop, 3H).



4.1.8.4. Síntese do composto **24** - 5-azido-3-*O*-alil-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranose

Este composto foi sintetizado de acordo com o procedimento descrito em **4.1.8.**, partindo do composto **23** (0,38g; 1,76mmol). O eluente para a coluna de cromatografia foi 4:1 Hex/AcOEt e o composto foi obtido com um rendimento de 87%, sob a forma de um óleo amarelado.

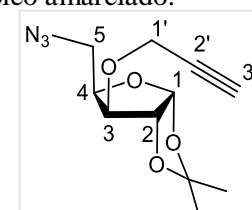
$R_f = 0,81$ (2:1, Hex/AcOEt); $[\alpha]_D^{20} = -28$ (c=1; CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5,92$ (d, $J_{H1,H2}=3,69$ Hz, H-1, 1H), 5,91-5,83 (m, H-2', 1H), 5,59 (d, $J_{H1,H2}=3,81$ Hz, H-2, 1H), 5,30 (dq, $J_{H3'a,H3'b} = J_{H3'a,H1'a} = J_{H3'a,H1'b} = 1,51$ Hz, $J_{H3'a,H2'} = 16,98$ Hz, H-3'a, 1H), 5,23 (dq, $J_{H3'a,H3'b} = J_{H3'b,H1'a} = J_{H3'b,H1'b} = 1,51$ Hz, $J_{H3'b,H2'} = 10,43$ Hz, H-3'b, 1H), 4,31 (td, $J_{H4,H5a,b} = 6,76$ Hz, $J_{H4,H3}=3,91$ Hz, H-4, 1H), 4,16 (ddt, $J_{H1'a,H2'}=5,53$ Hz, $J_{H1'a,H1'b}=12,71$ Hz, H-1'a, 1H), 4,00 (ddt, $J_{H1'b,H2'}=5,80$ Hz, H-1'b, 1H), 3,90 (d, $J_{H3,H4}=3,55$ Hz, H-3, 1H), 3,54 (m, H-5a,b, 2H), 1,50 (s, CH_3 , i-Prop, 3H), 1,32 (s, CH_3 , i-Prop, 3H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 133,65$ (C-2'), 117,94 (C-3'), 111,84 (Cq, i-Prop), 105,06 (C-1), 82,09 (C-2), 81,35 (C-3), 78,70 (C-4), 70,88 (C-1'), 49,06 (C-5), 26,79, 26,24 (2 CH_3 , i-Prop). **HRMS**: calcd. para $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 256.1292; experimental 256.1299.



4.1.8.5. Síntese do composto **25** - 5-azido-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilideno-3-*O*-propargil- α -D-xilofuranose

Este composto foi sintetizado de acordo com o procedimento descrito em **4.1.8.**, partindo do composto **23** (0,6g; 2,76mmol). O eluente para a coluna de cromatografia foi 4:1 Hex/AcOEt e o composto foi obtido com um rendimento de 95%, sob a forma de um óleo amarelado.

$R_f = 0,72$ (2:1, Hex/AcOEt); $[\alpha]_D^{20} = -25$ (c=1; CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5,91$ (d, $J_{H1,H2}=3,78$ Hz, H-1, 1H), 4,64 (d, $J_{H2,H3}=3,70$ Hz, H-2, 1H), 4,33-4,31 (m, H-4, 1H), 4,30-4,25 (m, parte A

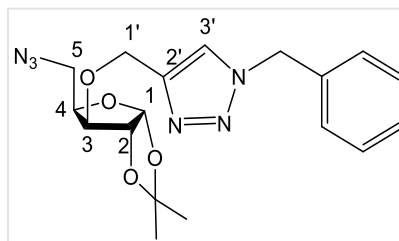


do sistema ABX, H1'a, 1H), 4,20 (dd, parte B do sistema ABX, $J_{H1'b,H1'a}=2,47$ Hz, $J_{H1'b,H3'}=13,38$ Hz, H1'b, 1H), 4,09 (d, $J_{H3,H4}=3,27$ Hz, H-3, 1H), 3,56 (dd, Parte A do sistema ABX, $J_{H5a,H5b}=12,73$ Hz, H-5a, 1H), 3,48 (dd, Parte B do sistema ABX, $J_{H5a,H4}=12,56$ Hz, H-5b, 1H), 2,51 (m, H3', 1H), 1,49 (s, CH₃, i-Prop, 3H), 1,32 (s, CH₃, i-Prop, 3H) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 111,95 (Cq, i-Prop), 105,04 (C-1), 81,94 (C-2), 81,18 (C-3), 78,71 (C-4), 75,47 (C-3'), 57,39 (C-1'), 49,20 (C-5), 26,75, 26,22 (2CH₃, i-Prop) ppm. **HRMS**: calcd. para C₁₁H₁₅N₃O₄ [M + H]⁺ 254.1135; experimental 254.1137.

4.1.8.6. Síntese do composto 39 - 5-Azida-3-O-(1-Benzil-1H-1,2,3-triazole-4-il)metil-5-desoxi-1,2-O-isopropilideno- α -D-xilofuranose

O composto foi obtido de acordo com o procedimento descrito em 4.1.8., partindo do produto da tosilção do composto 38 (0,1g, 0,227mmol). Foi feita uma coluna de cromatografia de forma a purificar o composto obtido, utilizando como eluente uma mistura de 2:1, éter de petróleo/AcOEt, tendo sido obtido o composto desejado, com um rendimento de 41% (óleo incolor).

R_f = 0,52 (1:1, Hex/AcOEt); $[\alpha]_D^{20} = -23$ (c=1; CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,48 (s, H-3', 1H), 7,41-7,40 (m, Ph, 3H), 7,31-7,28 (m, Ph, 2H), 5,91 (d, $J_{H1,H2}=3,62$ Hz, 1H), 5,55 (s, CH₂, Bn, 2H), 4,80 (d, Parte A do sistema AB, $J_{H1'a,H1'b}=12,40$ Hz, H-1'a, 1H), 4,58-4,54 (m, H-2, Parte B do sistema AB, 2H), 4,30 (td, $J_{H4,H5a,b} = 6,71$ Hz, $J_{H4,H3}=3,38$ Hz, H-4, 1H), 4,03 (d, $J_{H3,H4}=3,10$ Hz, H-3, 1H), 3,51 (dd, Parte A do sistema ABX, $J_{H5a,H4} = 6,57$ Hz, H-5a, 1H), 3,46-3,43 (dd, Parte B do sistema ABX, $J_{H5-b,H5-a}=12,33$ Hz, H-5b, 1H), 1,51 (s, CH₃, i-Prop, 3H), 1,33 (s, CH₃, i-Prop, 3H) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 144,55 (C-2'), 134,39 (Cq, Ph), 129,10; 128,89; 128,12 (5C, Ph), 122,59 (C-3'), 111,97 (Cq, i-Prop), 105,05 (C-1), 81,97 (C-2), 81,65 (C-3), 78,48 (C-4), 63,35 (C-1'), 54,27 (CH₂, Bn), 48,96 (C-5), 26,77; 26,23 (2CH₃, i-Prop) ppm. **HRMS**: calcd. para C₁₈H₂₂N₆O₄ [M + H]⁺ 387.1775; experimental 387.1779. calcd. para C₁₈H₂₂N₆O₄ [M + Na]⁺ 409.1595; experimental 409.1599.



4.1.9. Procedimento geral para a reação de guanidinilação

4.1.9.1. Método 1

O composto foi dissolvido em acetato de etilo ($c \sim 0,2$), sendo posteriormente adicionados 1equivalente de GN-Tf, 1,5equivalentes de DIPEA e 10%Pd/C (20%w/w). Foram efetuados 3 ciclos de N_2/H_2 e a reação foi deixada durante a noite, à temperatura ambiente. A mistura reacional foi filtrada com celite e posteriormente lavada duas vezes com AcOEt. Concentrou-se a mistura reacional e foi purificado através de uma coluna de cromatografia.

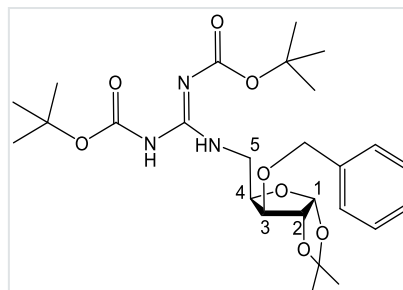
4.1.9.2. Método 2

O composto foi dissolvido em THF ($c \sim 0,2$), tendo sido adicionado água destilada ($\sim 0,10\text{mL}$) e 2equivalentes de trifenilfosfina. A mistura reacional foi deixada sob agitação, durante cerca de 4h, à temperatura ambiente. Após o término da reação, verificado por TLC, os solventes foram evaporados com auxílio de tolueno. Procedeu-se ao passo seguinte que consistiu em dissolver o produto obtido em AcOEt ($c \sim 0,2$), e colocar a atmosfera inerte. Adicionou-se 1equivalente de GN-Tf e 2equivalentes de DIPEA, tendo sido a mistura reacional deixada sob agitação durante cerca de 45 minutos. O término da reação foi verificado por TLC e a mistura reacional foi sujeita a extração líquido-líquido (AcOEt/ H_2O). As fases orgânicas combinadas foram secadas com sulfato de magnésio anidro e após filtração, o AcOEt foi evaporado e o resíduo obtido foi purificado através de uma coluna de cromatografia.

4.1.9.3. Síntese do composto 26 - 3-O-Benzil-5-[(N',N''-di-tert-butoxicarbonil)guanidino]-5-desoxi-1,2-O-isopropilideno- α -D-xilofuranose

O composto foi obtido de acordo com os procedimentos descritos em 4.1.9.1. e 4.1.9.2., partindo do composto 17 (0,06g; 0,197mmol). Em ambos os métodos, foi feita uma coluna de cromatografia, utilizando como eluente 6:1, éter de petróleo/AcOEt. O composto foi obtido pelo método 1 com rendimento de 89% e pelo método 2 com rendimento de 79% (óleo incolor).

$R_f = 0,42$ (2:1 Hexano/AcOEt); $[\alpha]_D^{20} = -23$ ($c=1$; CH_2Cl_2); 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7,34$ (m, Bn, 5H), 5,97 (d, $J_{H1,H2}=3,83$ Hz, H-1, 1H), 4,69 (d, Parte A do sistema AB, $J_{Ha,Hb} = 11,70$ Hz, CH_2 , Bn, 1H), 4,65 (d, $J_{H2,H1}=3,88$ Hz, H-2, 1H), 4,55 (d, Parte B do sistema AB, CH_2 -Bn, 1H), 4,36 (m, H-4, 1H), 3,96 (d, $J_{H3,H2}=3,47$ Hz, H-3, 1H), 3,91 (dd,



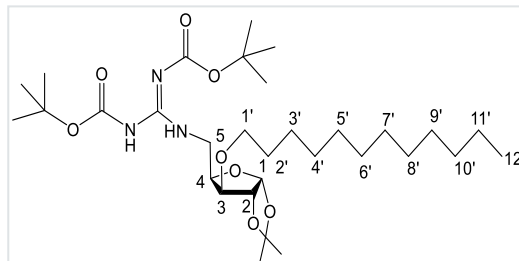
Parte A do sistema ABX, $J_{H5a,H4} = 4,83$ Hz, $J_{H5a,H5b}=13,45$ Hz, H-5a, 1H), 3,65 (dd, Parte B do sistema ABX, $J_{H5b,H4}=7,09$ Hz, H-5b, 1H), 1,50 (m, 6 CH_3 -2Boc, CH_3 -i,Prop, 21H), 1,32 (s, CH_3 , i-Prop, 3H)ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 163,23 (Cq, GN), 156,42 (C=O, Boc),

152,96 (C=O, Boc), 137,10 (Cq, Ph), 128,54, 128,05, 127,89 (Ph), 111,86 (Cq, i-Prop), 104,99 (C-1), 83,32 (Cq, Boc), 82,13 (C-2), 82,07 (C-3), 79,63 (Cq, Boc), 78,14 (C-4), 71,92 (CH₂, Bn) 39,34 (C-5), 28,21 28,03 (6CH₃, Boc), 26,62, 26,15 (Cq, i-Prop) ppm. **HRMS**: calcd. para C₂₆H₃₉N₃O₈ [M + H]⁺ 522.2810; experimental 522.2810.

4.1.9.4. Síntese do composto 27 – 5-[(N',N''-di-*tert*-butoxicarbonil)guanidino]-3-*O*-dodecil-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranose

O composto foi obtido de acordo com os procedimentos descritos em 4.1.9.1. e 4.1.9.2., partindo do composto **18** (método 1: 0,05g; 0,16mmol/ método 2: 0,07g; 0,18mmol). Em ambos os métodos, foi feita uma coluna de cromatografia, utilizando como eluente 20:1, éter de petróleo/AcOEt. O composto foi obtido pelo método 1 com rendimento de 86% e pelo método 2 com rendimento de 81% (óleo incolor).

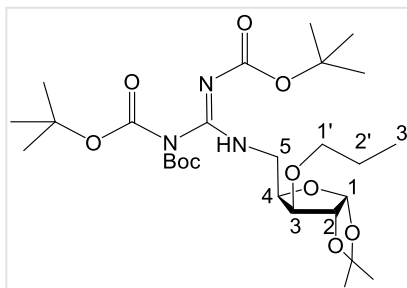
R_f = 0,57 (10:1, Hexano/AcOEt); [α]_D²⁰ = -15 (c=1; CH₂Cl₂); **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ = 5,92 (d, J_{H1,H2}=3,58 Hz, H-1, 1H), 4,53 (d, J_{H2,H1}=3,58 Hz, H-2, 1H), 4,37-4,31 (m, H-4, 1H), 3,90-3,84 (m, H-5a, 1H), 3,79 (d, J_{H3,H2}=3,24 Hz, H-3, 1H), 3,68-3,62 (m, Parte B do sistema ABX, H-5b, 1H), 3,62-3,56 (m, H-1'a, 1H), 3,43-3,37 (m, H-1'b, 1H), 1,56-1,47 (m, H-2',3',4',5',6',7',8',9',10',11', CH₃-i-Prop, 23H), 1,30-1,21 (m, 6CH₃-Boc, CH₃-i-Prop, 24H), 0,91-0,85 (t, J_{H12',H11'a} = J_{H12',H11'b} = 6,57 Hz, H-12', 3H) ppm. **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ = 163,53 (Cq, GN), 156,38 (C=O, Boc), 152,85 (C=O, Boc), 111,50 (Cq, i-Prop), 105,14 (C-1), 82,92 (Cq, Boc), 82,86 (C-2), 82,16 (C-3), 79,14 (Cq, Boc), 77,96 (C-4), 70,47 (C-1'), 39,29 (C-5), 31,90; 29,62; 26,56; 29,44; 29,34 (6CH₃, Boc), 28,27; 28,03 (2CH₃, i-Prop), 27,81; 26,74; 26,23; 26,07; 22,68 (C-2',3',4',5',6',7',8',9',10',11'), 14,12 (C-12')ppm. **HRMS**: calcd. para C₃₁H₅₇N₃O₈ [M + H]⁺ 600.4218; experimental 600.4216.



4.1.9.5. Síntese do composto 28 - 5-[(N',N''-di-*tert*-butoxicarbonil)guanidino]-3-*O*-propil-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranose

O composto foi obtido de acordo com o procedimento descrito em 4.1.9.1., partindo do composto **25** (0,15g; 0,6mmol). Foi feita uma coluna de cromatografia utilizando como eluente 10:1, Hex/AcOEt e o composto foi obtido com um rendimento de 60% (óleo amarelado).

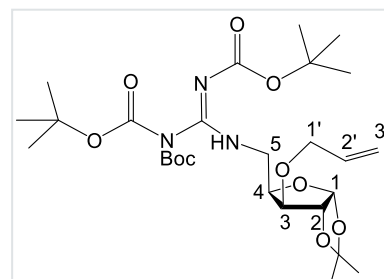
$R_f = 0,67$ (6:1, Hexano/AcOEt); $[\alpha]_D^{20} = -16$ ($c=1$; CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,63$ (t, $J = 4,70$ Hz, NH, 1H), 5,94 (d, $J_{H1,H2}=3,80$ Hz, H-1, 1H), 4,57 (d, $J_{H2,H1}=3,84$ Hz, H-2, 1H), 4,38-4,35 (m, H-4, 1H), 3,91 (ddd, H-5a, 1H), 3,82 (d, $J_{H3,H2}=3,52$ Hz, H-3, 1H), 3,69 (ddd, H-5b, $J_{H5a,H5b} = 13,58$ Hz, $J_{H5b,H4} = 7,03$ Hz, $J_{H5b,NH} = 4,70$ Hz, 1H), 3,60-3,54 (m, Parte A do sistema ABX, H-1'a, 1H), 3,43-3,38 (m, Parte B do sistema ABX, H-1'b, 1H), 1,61 (sext, $J_{H2',H3a,b'} = J_{H2',H1a,b'} = 7,01$ Hz, H-2', 2H), 1,54 (s, CH_3 , i-Prop, 3H), 1,51-1,49 (m, 6 CH_3 , 2Boc, CH_3 -i-prop, 21H), 1,32 (s, CH_3 , i-Prop, 3H), 0,94 (t, $J_{H3'a,H2'} = J_{H3'b,H2'} = 7,26$ Hz, H-3', 3H)ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 163,52$ (Cq, GN), 156,39 (C=O, Boc), 152,88 (C=O, Boc), 111,55 (Cq, i-Prop), 105,13 (C-1), 82,96 (Cq, Boc), 82,91 (C-3), 82,19 (C-2), 79,23 (Cq, Boc), 78,01 (C-4), 71,96 (C-1'), 39,31 (C-5), 28,28; 28,05; 27,82 (3 CH_3 , Boc), 26,75; 26,24 (2 CH_3 , i-Prop), 22,87 (C-2'), 10,57 (C-3')ppm. **HRMS**: calcd. para $\text{C}_{22}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_8$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 474.2810; experimental 474.2812.



4.1.9.6. Síntese do composto 29 - 3-O-allyl-5-[(N',N''-di-tert-butoxycarbonyl)guanidino]-5-desoxi-1,2-O-isopropilideno-α-D-xilofuranose

O composto foi obtido de acordo com o procedimento descrito em 4.1.9.2., partindo do composto **24** (0,06g; 0,235mmol). Foi feita uma coluna de cromatografia utilizando como eluente 8:1, Hex/AcOEt e o composto foi obtido com um rendimento de 88% (óleo incolor).

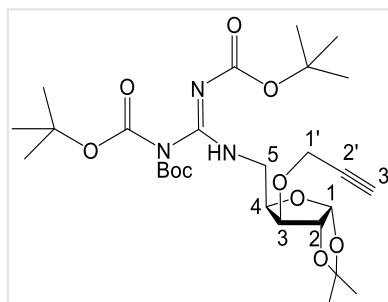
$R_f = 0,68$ (4:1 Hexano/AcOEt); $[\alpha]_D^{20} = -12$ ($c=1$; CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5,95$ (d, $J_{H1,H2}=3,98$ Hz, H-1, 1H), 5,94-5,86 (m, H-2', 1H), 5,30 (dq, $J_{H3'a,H3'b} = J_{H3'a,H1'a} = J_{H3'a,H1'b} = 1,31$ Hz, $J_{H3'a,H2'} = 16,49$ Hz, H-3'a, 1H), 5,22 (dq, $J_{H3'a,H3'b} = J_{H3'b,H1'a} = J_{H3'b,H1'b} = 1,51$ Hz, $J_{H3'b,H2'} = 10,30$ Hz, H-3'b, 1H), 4,59 (d, $J_{H2,H1}=4,13$ Hz, H-2, 1H), 4,38-4,34 (m, H-4, 1H), 4,15 (ddt, $J_{H1'a,H2'}=5,34$ Hz, $J_{H1'a,H1'b}=12,65$ Hz, H-1'a, 1H), 4,00 (ddt, $J_{H1'b,H2'}=6,02$ Hz, H-1'b, 1H), 3,90 (ddd, $J_{H5a,H5b} = 13,88$ Hz, H-5a, 1H), 3,90 (d, $J_{H3,H2}=3,32$ Hz, H-3, 1H), 3,67 (ddd, $J_{H5b,H4} = 7,10$ Hz, $J_{H5b,NH} = 4,75$ Hz, H-5b, 1H), 1,54-1,50 (m, 6 CH_3 -Boc, CH_3 -i-Prop, 21H), 1,32 (s, CH_3 , i-Prop, 3H)ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 163,49$ (Cq, GN), 156,39 (C=O, Boc), 152,91 (C=O, Boc), 133,81 (C-2'), 118,03 (C-3'), 111,62 (Cq, i-Prop), 105,09 (C-1), 83,02 (Cq, Boc), 82,25 (H-3), 81,97 (C-2), 79,28 (Cq, Boc), 78,01 (C-4), 71,01 (C-1'), 39,34 (C-5), 28,27, 27,82 (6 CH_3 , Boc), 26,71, 26,22 (2 CH_3 , i-Prop) ppm. **HRMS**: calcd. para $\text{C}_{22}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_8$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 472.2653; experimental 472.2655.



4.1.9.7. Síntese do composto 30 - 5-[(N',N''-di-*tert*-butoxicarbonil)guanidino]-3-*O*-propargil-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranose

O composto foi obtido de acordo com o procedimento descrito em 4.1.9.2., partindo do composto **25** (0,065g; 0,26mmol). Foi feita uma coluna de cromatografia utilizando como eluente 8:1, Hex/AcOEt e o composto foi obtido com um rendimento de 95% (óleo incolor).

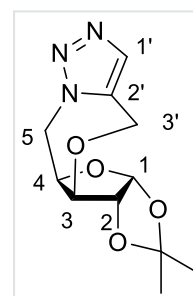
$R_f = 0,72$ (4:1 (Hexano/AcOEt); $[\alpha]_D^{20} = -13$ (c=1; CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 5,95$ (d, $J_{H1,H2}=3,74$ Hz, H-1, 1H), 4,68 (d, $J_{H2,H1}=3,92$ Hz, H-2, 1H), 4,41-4,37 (m, H-4, 1H), 4,33-4,23 (m, H-1'a, H-1'b, 2H), 4,13 (d, $J_{H3,H2}=3,15$ Hz, H-3, 1H), 3,95 (m, ddd, $J_{H5a,H5b} = 13,80$ Hz, H-5a, 1H), 3,62 (ddd, $J_{H5b,H4} = 7,24$ Hz, $J_{H5b,NH} = 4,53$ Hz, H-5b, 1H), 2,49 (s, H-3', 1H), 1,55-1,51 (m, 6CH₃ – Boc, CH₃ – i-Prop, 21H), 1,34 (s, CH₃, i-Prop, 3H)ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 163,49$ (Cq, GN), 156,40 (C=O, Boc) 152,90 (C=O, Boc), 111,74 (Cq, i-Prop), 104,99 (C-1), 83,02 (C-2'), 82,17 (C-2), 81,77 (C-3), 79,26; 78,89 (Cq, Boc), 78,05 (C-4), 75,5 (C-3'), 57,42 (C-1'), 39,27 (C-5), 28,29, 28,08 (6CH₃-Boc), 26,71 26,24 (2CH₃, i-Prop) ppm.



4.1.10. Formação intramolecular do ciclo triazole (31) - 3,5'-Anidro-5-desoxi-5-(5-hidroximetil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranose

Dissolveram-se 60mg (0,23mmol) do composto **25** em 5mL de tolueno e colocou-se a mistura reacional a aquecer a uma temperatura de 110°C, com agitação e durante 2h. Verificou-se por TLC (1:1, AcEtO/éter de petróleo) o término da reação. Concentrou-se o meio reacional no evaporador rotativo, sendo obtido um sólido esbranquiçado que foi filtrado sob vácuo e lavado com éter de petróleo. Foram obtidos 40mg de um pó branco ($\eta=67\%$).

$R_f = 0,68$ (4:1 Hexano/AcOEt); p.f. = 201,0°C-203,1°C $[\alpha]_D^{20} = -12$ (c=1; CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7,48$ (s, H-1', 1H), 5,75 (d, $J_{H1,H2}=3,77$ Hz, H-1, 1H), 5,09 (dd, Parte A do sistema ABX, $J_{H5a,H5b}=14,94$ Hz, $J_{H5a,H4}=5,52$ Hz, H-5a, 1H), 4,89 (d, Parte A do sistema AB, $J_{H3'a,H3'b}=15,03$ Hz, H-3'a 1H), 4,67 (dd, Parte B do sistema ABX, $J_{H5b,H4}=2,16$ Hz, H-5b, 1H), 4,55 (d, Parte B do sistema AB, H-3'b, 1H), 4,47 (d, $J_{H2,H1}=3,72$ Hz, H-2, 1H), 4,36 (m, H-4, 1H), 4,20 (s, H-3, 1H), 1,44 (s, CH₃, i-Prop, 3H), 1,24 (s, CH₃, i-Prop, 3H) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 135,02$ (C-2'), 132 (C-1'), 111,98 (Cq, i-Prop), 104,58 (C-1), 84,35



(C-3), 83,73 (C-2), 73,98 (C-4), 60,29 (C-3'), 47,96 (C-5), 26,45, 25,87 (2CH₃, i-Prop) ppm.

HRMS: calcd. para C₁₁H₁₅N₃O₄ [M + H]⁺ 254.1135; experimental 254.1136.

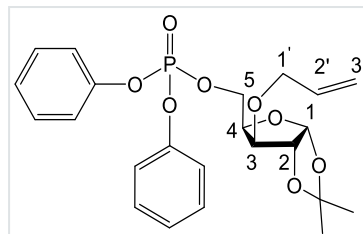
4.1.11. Procedimento geral para a introdução do grupo difenil fosfato

O composto foi dissolvido em tolueno (c~0,1) e a solução arrefecida a 0°C. Foram adicionados 1,2equivalentes de difenilfosforil azida (DPPA) e 1,2equivalentes de DBU, em atmosfera inerte, e sob agitação, tendo o meio reacional ficado a 0°C durante 2h e a temperatura ambiente durante 16h. A reação foi acompanhada por TLC hexano/AcOEt (2:1). A mistura reacional foi lavada com água destilada (2x) e solução aquosa de ácido clorídrico a 5%, tendo sido a fase orgânica posteriormente secada com sulfato de magnésio anidro e concentrada.

4.1.11.1. Síntese do composto 32 - Difenil(3-*O*-alil-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranos-5-il)fosfato ou 3-*O*-Alil-5-*O*-difenilfosfono-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranose

O composto foi sintetizado tendo em conta o procedimento descrito em 4.1.11., partindo do composto **13** (0,71g; 3,1mmol), tendo sido obtido um óleo incolor (η =98%).

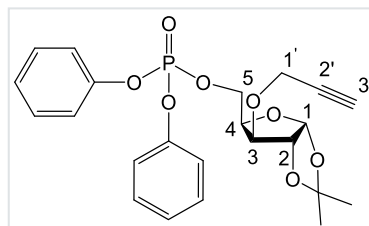
R_f = 0,47 (2:1, Hex/AcOEt); $[\alpha]_D^{20}$ = -43 (c=1; CH₂Cl₂); **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,41-7,18 (m, 2Ph, 10H), 5,94 (s, H-1, 1H), 5,87-5,77 (m, CH-2', 1H), 5,25 (dq, $J_{H3'a,H3'b} = J_{H3'a,H1'a} = J_{H3'a,H1'b} = 1,40$ Hz, $J_{H3'a,H2'} = 16,04$ Hz, H-3'a, 1H), 5,19 (dq, $J_{H3'a,H3'b} = J_{H3'b,H1'a} = J_{H3'b,H1'b} = 1,49$ Hz, $J_{H3'b,H2'} = 10,35$ Hz, H-3'b, 1H), 4,57 (s, H-2, 1H), 4,55-4,46 (m, H-4, H-5a,b, 3H), 4,08 (ddt $J_{H1'a,H2'} = 5,32$ Hz, $J_{H1'a,H1'b} = 12,63$ Hz, H-1'a, 1H), 3,95-3,90 (m, H-1'b, H-3, 2H), 1,48 (s, CH₃, i-Prop, 3H), 1,33 (s, CH₃, i-Prop, 3H) ppm. **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ = 150,50 (d, $J_{C-P} = 2,38$ Hz, Cq, Ph) 150,43 (d, $J_{C-P} = 2,38$ Hz, Cq, Ph), 133,68 (C-2') 130,09, 129,84, 129,63, 128,24, 126,18, 125,46, 120,25, 120,13, 120,07 (C-2Ph), 117,92 (C-3'), 111,97 (Cq, i-Prop), 82,16 (C-2), 81,15 (C-3), 78,52, (d, $J_{C4-P} = 8,46$ Hz, C-4), 71,06 (C-1'), 66,20 (d, $J_{C5-P} = 5,68$ Hz, C-5), 26,87, 26,31 (2CH₃, i-Prop) ppm. **³¹P-RMN** (142 MHz, CDCl₃): δ = -12,09ppm. **HRMS:** calcd. para C₂₃H₂₇O₈P [M + H]⁺ 463.1516, experimental: 463.1527; calcd. para C₂₃H₂₇O₈P [M + Na]⁺ 485.1336, experimental: 485.1348.



4.1.11.2. Síntese do composto 33 - Difenil(5-desoxi-1,2-*O*-isopropilideno-3-*O*-propargil- α -D-xilofuranos-5-il)fosfato ou 5-*O*-difenilfosfono-1,2-*O*-isopropilideno-3-*O*-propargil - α -D-xilofuranose

O composto foi sintetizado tendo em conta o procedimento descrito em 4.1.11, partindo do composto **14** (0,1g; 0,44mmol), sendo que foi necessário adicionar mais equivalentes de DBU (um total de 2equivalentes) e foi necessário aquecer a 40°C, para promover a progressão da reação. Foi feita uma coluna de cromatografia para purificar o composto, utilizando como eluente 4:1, Hex/AcOEt, tendo sido obtido um óleo incolor (η =68%).

$R_f = 0,41$ (2:1, Hex/AcOEt); $[\alpha]_D^{20} = -46$ ($c=1$; CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,38\text{--}7,19$ (m, 2Ph, 10H), 5,94 (d, $J_{\text{H1,H2}}=3,67$ Hz, 1H), 4,66 (d, $J_{\text{H1,H2}}=3,88$ Hz, H-2, 1H), 4,51-4,43 (m, H-4, H-5a,H-5b, 3H), 4,17-4,12 (m, H-1'a, H-1'b, H-3, 3H), 2,48 (m, H-3', 1H), 1,49 (s, CH_3 , i-Prop, 3H), 1,33 (s, CH_3 , i-Prop, 3H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 150,49$ (d, $J_{\text{C,P}}=2,94$ Hz, Cq, Ph), 150,42 (d, $J_{\text{C,P}}=2,70$ Hz, Cq, Ph), 129,82, 125,43, 125,43, 120,14 (2Ph), 112,11 (Cq, i-Prop), 105,25 (C-1), 82,04 (C-2), 81,08 (C-3), 78,72 (C-3'), 78,41 (d, $J_{\text{C,P}}=8,63$ Hz, C-4), 75,53 (Cq, C-2'), 66,16 (d, $J_{\text{C,P}}=6,17$ Hz, C-5), 57,58 (C-1'), 26,85, 26,32 (2 CH_3 , i-Prop) ppm. $^{31}\text{P-RMN}$ (142 MHz, CDCl_3): $\delta = 12,06$ ppm. **HRMS**: calcd. para $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{O}_8\text{P}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 461.1360; experimental 461.1362. calcd. para $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{O}_8\text{P}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 483.1179; experimental 483.1183.



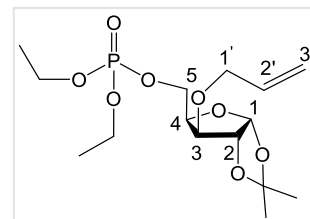
4.1.12. Procedimento geral para a introdução do grupo dietil fosfato

O composto foi dissolvido em DCM ($c \sim 0,2$) e a mistura reacional foi arrefecida a 0°C e colocada sob atmosfera inerte. Foram adicionados 1,5equivalentes de trietilamina, DMAP (quantidade catalítica) e 1,2equivalentes clorofosfato de dietilo. A mistura reacional foi deixada sob agitação e à temperatura ambiente durante a noite, tendo sido verificado o término da reação por TLC. À mistura reacional foi adicionada água e DCM, as fases foram separadas e a fase aquosa foi extraída com DCM (2x). As fases orgânicas combinadas foram secadas com sulfato de magnésio anidro e concentrada, originando um óleo incolor.

4.1.12.1. Síntese do composto 35 – Dietil (3-*O*-alil-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranos-5-il)fosfato ou 3-*O*-Alil-5-*O*-dietilfosfono-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranose

O composto foi sintetizado tendo em conta o procedimento descrito em **4.1.12.**, partindo do composto **13** (0,25g; 1,09mmol), tendo sido obtido um óleo incolor com um rendimento de 97%.

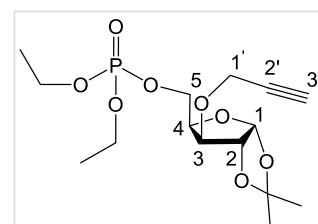
$R_f = 0,44$ (1:1, Hex/AcOEt); $[\alpha]_D^{20} = -26$ (c=1; CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 5,93$ (d, $J_{H1,H2}=3,82$ Hz, H-1, 1H), 5,91-5,80 (m, H-2', 1H), 5,30-5,19 (m, H-3', 2H), 4,56 (d, $J_{H2,H1}=3,76$ Hz, H-2, 1H), 4,44-4,40 (m, H-4, 1H), 4,30-4,19 (m, H-5a, H-5b, 2H), 4,18 (m, Parte A do sistema ABX, H-1'a, 2CH₂-Et, 5H), 4,00-3,95 (dd, Parte B do sistema ABX, $J_{H1'b,H1'a}=12,90$ Hz, $J_{H1'b,H2'}=5,69$ Hz, H-1'b, 1H), 3,94 (d, $J_{H3,H4}=3,21$ Hz, H-3, 1H), 1,49 (s, CH₃, i-Prop, 3H), 1,38-1,31 (m, CH₃-i-Prop, 2CH₃-Et, 9H) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 133,71$ (C-2'), 117,87 (C-3'), 111,86 (Cq, i-Prop), 105,19 (C-1), 82,18 (C-2), 82,26 (C-3), 78,82 (d, $J_{C-P}=8,69$ Hz, C-4), 71,07 (C-1'), 64,73 (d, $J_{C-P}=5,24$ Hz, C-5), 63,96 (d, $J_{C-P}=2,54$ Hz, CH₂, Et), 63,90 (d, $J_{C-P}=2,54$ Hz, CH₂, Et), 26,81 26,28 (2CH₃, i-Prop), 16,13, 16,07 (2CH₃, Et) ppm. ³¹P-RMN (142 MHz, CDCl₃): $\delta = -1,21$ ppm. HRMS: calcd. para C₁₅H₂₇O₈P [M + H]⁺ 367.1516; experimental 367.1521; calcd. para C₁₅H₂₇O₈P [M + Na]⁺ 389.1336; experimental 389.1336.



4.1.12.2. Síntese do composto 36 - Dietil(5-desoxi-1,2-O-isopropilideno-3-O-propargil-α-D-xilofuranos-5-il)fosfato ou 5-O-dietilfosfono-1,2-O-isopropilideno-3-O-propargil-α-D-xilofuranose

O composto foi sintetizado tendo em conta o procedimento descrito em **4.1.12.**, partindo do composto **14** (0,1g; 0,438mmol), tendo sido obtido um óleo incolor com um rendimento de 98%.

$R_f = 0,35$ (2:1, Hex/AcOEt); $[\alpha]_D^{20} = -24$ (c=1; CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 5,89$ (d, $J_{H1,H2}=3,89$ Hz, H-1, 1H), 4,61 (d, $J_{H2,H1}=3,82$ Hz, H-2, 1H), 4,42 (m, H-4, 1H), 4,24-4,06 (m, H-3, H5a, H5b, 2CH₂, Et, H-1', 9H), 2,47 (t, $J_{H3',H4,b1'}=2,37$ Hz, H-3', 1H), 1,46 (s, CH₃, i-Prop, 3H), 1,32-1,29 (m, 2CH₃-Et, CH₃-i-Prop, 9H) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 111,94$ (Cq, i-Prop), 105,14 (H-1), 81,97 (H-2), 81,06 (H-3), 78,70 (d, $J_{C-P}=5,03$ Hz, H-4), 75,43 (H-3'), 64,74 (d, $J_{C-P}=5,46$ Hz, C-5), 63,96 (d, $J_{C-P}=2,50$ Hz, CH₂, Et), 63,90 (d, $J_{C-P}=2,40$ Hz, CH₂, Et), 57,49 (C-3'), 26,76 (s, CH₃, i-Prop), 26,25 76 (s, CH₃, i-Prop) 16,10 76 (s, CH₃, Et), 16,03 (s, CH₃, Et) ppm. ³¹P-RMN (142 MHz, CDCl₃): $\delta = -1,18$ ppm. HRMS: calcd. para C₁₅H₂₅O₈P [M + H]⁺ 387.1179; experimental 387.1179. calcd. para C₁₅H₂₅O₈P [M + Na]⁺ 365.1360; experimental 365.1358.



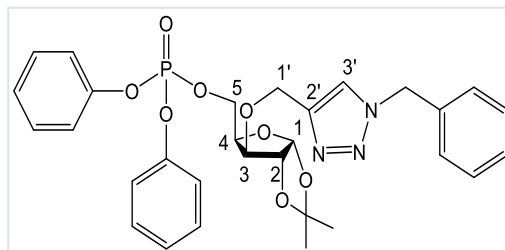
4.1.13. Procedimento geral para a Click-chemistry

O composto foi dissolvido em DCM ($c \sim 0,2$), tendo sido posteriormente adicionado 1,2equivalentes de azida de benzilo e CuI/Amberlyste A21 (0,5mmol/g). A mistura reacional foi deixada sob agitação suave e atmosfera inerte. Verificou-se o término da reação por TLC e o catalisador foi filtrado, tendo sido evaporado o solvente no evaporador rotativo e o óleo obtido foi submetido a uma coluna de cromatografia em sílica gel.

4.1.13.1. Síntese do composto 34 - 3-*O*-(1-Benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil-1,2-*O*-isopropilideno-5-*O*-difenilfosfono- α -D-xilofuranose ou Difenil [3-*O*-(1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranos-5-il]fosfato

O composto foi sintetizado tendo em conta o procedimento descrito em 4.1.13., partindo do composto **33** (0,124g, 0,27mmol), utilizando azida de benzilo (0,04mL; 0,32mmol) e 0,06mmol de catalisador CuI/A21. Foi feita uma coluna de cromatografia utilizando como eluente 2:1, éter de petróleo/AcOEt, tendo sido obtido um óleo incolor com um rendimento de 70%.

$R_f = 0,29$ (2:1, Hex/AcOEt); $[\alpha]_D^{20} = -21$ ($c=1$; CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,54$ (H, H-3', 1H), 7,36-7,18 (m, 3Ph, 15H), 5,89 (d, $J_{H1,H2}=3,94$ Hz, H-1, 1H), 5,46 (m, CH_2 , Bn, 2H), 4,73 (d, Parte A do sistema AB, $J_{H1'a,H1'b}=11,61$ Hz, H-1'a, 1H), 4,65 (d, $J_{H2,H1}=3,67$ Hz, H-2, 1H), 4,51 (d, H-1'b, 1H), 4,50-4,38 (m, H-4, H-5a, H-5b, 3H), 4,01 (s, H-3, 1H), 1,48 (s, CH_3 , i-Prop, 3H), 1,32 (s, CH_3 , i-Prop, 3H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 150,39$ (d, $J_{C,P}=7,51$ Hz, Cq, Ph), 150,39 (d, $J_{C,P}=7,41$ Hz, Cq, Ph), 134,58 (Cq, Ph, Bn), 129,86, 129,09, 128,73, 128,73, 128,10, 125,52, 120,10, 120,03 (3Ph), 123,01 (C-3'), 112,08 (Cq, i-Prop), 105,21 (C-1), 81,89 (C-2), 81,34 (C-3), 78,09 (d, $J_{C,P}=9,66$ Hz, C-4), 65,56 (d, $J_{C,P}=9,66$ Hz, C-5), 63,68 (C-1'), 54,16 (CH_2 , Bn), 26,83, 26,26 (2 CH_3 , i-Prop) ppm. $^{31}\text{P-RMN}$ (142 MHz, CDCl_3): $\delta = -12,09$ ppm. **HRMS**: calcd. para $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_8\text{P}$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ 594.2000; experimental 594.2004.

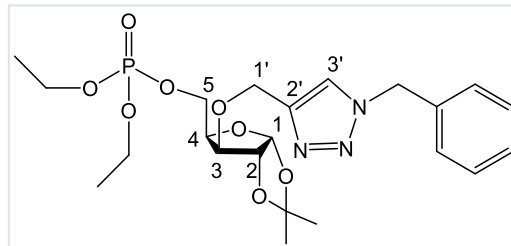


4.1.13.2. Síntese do composto 37 - 3-*O*-(1-Benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil-1,2-*O*-isopropilideno-5-*O*-dietilfosfono- α -D-xilofuranose ou Dietil [3-*O*-(1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranos-5-il]fosfato

O composto foi sintetizado tendo em conta o procedimento descrito em 4.1.13., partindo do composto **36** (0,1g, 0,37mmol) utilizando azida de benzilo (0,06mL, 0,44mmol) e 0,05mmol

de catalisador CuI/A21. Foi feita uma coluna de cromatografia utilizando como eluente 2:1, éter de petróleo/AcOEt, tendo sido obtido um óleo amarelado com um rendimento de 70%.

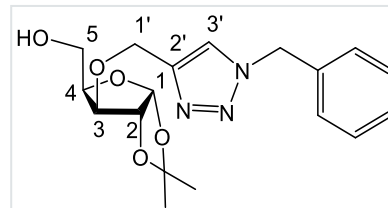
$R_f = 0,51$ (1:1 Hex/AcOEt); $[\alpha]_D^{20} = -23$ (c=1; CH₂Cl₂); **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7,59$ (s, H-3', 1H), 7,38-7,28 (m, Ph, 5H), 5,90 (d, $J_{H1,H2}=3,86$ Hz, H-1, 1H), 5,58-5,49 (m, CH₂, Bn, 2H), 4,79-4,76 (d, Parte A do sistema AB, $J_{H1'a}$, $H1'b=12,42$ Hz, H-1'a, 1H), 4,65-4,62 (m, H-1'b, H-2, 2H), 4,43-4,39 (m, H-4, 1H), 4,24-4,15 (m, H-5a, H-5b, 2H), 4,09 (q, $J_{H,H}=7,32$ Hz, 2CH₂, Et, 4H), 4,05 (d, $J_{H3,H2}=3,04$ Hz, 1H), 1,49 (s, CH₃, i-Prop, 3H), 1,33-1,29 (m, 2CH₃-Et, 1CH₃-i-Prop, 9H) ppm. **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 144,63$ (C-2') 134,59 (Cq, Ph), 129,11; 128,75; 128,12 (CH, Ph), 122,83 (C-3'), 111,96 (Cq, i-Prop), 105,15 (C-1), 81,98 (C-2), 81,52 (C-3), 78,53 (d, $J_{C,P}=8,78$ Hz, C-4), 64,38 (d, $J_{C,P}=5,44$ Hz, C-5), 64,03; 63,96 (d, $J_{C,P}=3,91$ Hz, 2CH₂, Et), 63,71 (C-1'), 54,18 (CH₂, Bn), 26,79; 26,24 (2CH₃, i-Prop), 16,14-16,07 (2CH₃, Et) ppm. **³¹P-RMN** (142 MHz, CDCl₃): $\delta = -1,26$ ppm. **HRMS**: calcd. para C₂₂H₃₂N₃O₈P [M + H]⁺ 498.2000; experimental 498.2009.



4.1.13.3. Síntese do composto 38 - 3-O-(1-Benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil-1,2-O-isopropilidene-α-D-xilofuranose ou 1-Benzil-4-[(3-desoxi-1,2-O-isopropilideno-D-xilofuranos-3-iloxi)metil]-1H-1,2,3-triazole

O composto foi sintetizado tendo em conta o procedimento descrito em 4.1.13., partindo do composto **14** (0,2g, 0,88mmol), utilizando azida de benzilo (0,19mL; 1,06mmol) e 0,1mmol de catalisador CuI/A21. Foi feita uma coluna de cromatografia utilizando como eluente 1:1, éter de petróleo/AcOEt, tendo sido um óleo incolor com um rendimento de 98%.

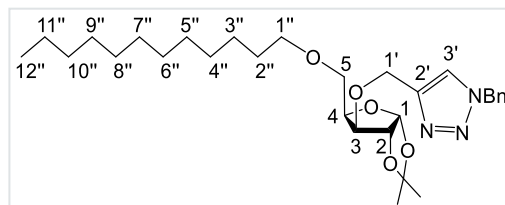
$R_f = 0,28$ (1:1, Hex/AcOEt); $[\alpha]_D^{20} = -33$ (c=1; CH₂Cl₂); **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7,47$ (s, H-3', 1H), 7,36-7,34 (m, Ph, 3H), 7,26-7,24 (m, Ph, 2H), 5,91 (d, $J_{H1,H2}=3,67$ Hz, H-1,1H), 5,49 (s, CH₂, Bn, 2H), 4,79 (d, Parte A do sistema AB, $J_{H1'a,H1'b}=12,91$ Hz, H-1'a, 1H), 4,63-4,60 (m, H-1'b, H-2, 2H), 4,31-4,29 (m, H-4, 1H), 4,07 (d, $J_{H3,H4}=3,38$ Hz, H-3, 1H), 3,88-3,78 (m, H-5, 2H), 1,46 (s, CH₃, i-Prop, 3H), 1,29 (s, CH₃, i-Prop, 3H) ppm. **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 144,60$ (C-2'), 139,31 (Cq, Ph), 129,16; 128,12; 128,87 (5C, Ph), 122,26 (C-3'), 111,75 (Cq, i-Prop), 105,10 (C-1), 82,39 (C-2), 82,33 (C-3), 80,10 (C-4), 63,12 (C-1'), 59,50 (CH₂, Bn), 54,36 (C-5), 26,75; 26,29 (CH₃, i-Prop) ppm. **HRMS**: calcd. para C₁₈H₂₃N₃O₅ [M + H]⁺ 362.1710; experimental 362.1713. calcd. para C₁₈H₂₃N₃O₅ [M + Na]⁺ 384.1530; experimental 384.1532.



4.1.13.4. Síntese do composto 42 – 3-*O*-(1-Benzil-1*H*-1,2,3-triazole-4-il)metil-5-*O*-dodecil-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranose ou 1-Benzil-4-[(3-deoxi-5-*O*-dodecil-1,2-*O*-isopropilideno-D-xilofuranos-3-iloxi)metil]-1*H*-1,2,3-triazole

Este composto foi sintetizado de acordo com o procedimento descrito em 4.1.13., partindo do composto **38** (30mg, 0,08mmol). Foi feita uma coluna de cromatografia utilizando 3:1 Hexano/AcOEt e o composto desejado foi obtido com um rendimento de 95%, sob a forma de um sólido branco.

R_f 0,35 (2:1, Hex/AcOEt); p.f. = 42,7°C-43,4°C; $[\alpha]_D^{20} = -15$ (c=1; CH₂Cl); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,46 (s, H-3', 1H), 7,40-7,28 (m, Ph, 5H), 5,90 (d, $J_{H1,H2}=3,76$ Hz, H-1, 1H), 5,54 (s, CH₂, Bn, 2H), 4,77 (d, Parte A do sistema AB, $J_{H1'a,H1'b}=12,57$ Hz, H-1'a, 1H), 4,67 (d, Parte B do sistema AB, $J_{H1'b,H1'a}=12,60$ Hz, H-1'b, 1H), 4,60 (d, $J_{H2,H1}=3,81$ Hz, H-2, 1H), 4,37-4,33 (m, H-4, 1H), 4,02 (d, $J_{H3,H4}=3,03$ Hz, H-3, 1H), 3,66-3,58 (m, H-5, 2H), 3,46 (dt, $J_{H1''a,H1''b}=16,07$ Hz, H-1''a, 1H), 3,38 (dt, $J_{H1''a,H2''}=J_{H1''b,H2''}=6,71$ Hz, H-1''b, 1H), 1,56-1,53 (m, H-2'', 2H), 1,50 (s, CH₃, 3H), 1,31 (s, CH₃, 3H), 1,26 (m, H-3'',4'',5'',6'',7'',8'',9'',10'',11''), 0,89 (t, $J_{H-12'',H-11''a}=J_{H-12'',H-11''b}=7,11$ Hz, 3H) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 145,24 (C-2'), 134,51 (Cq, Ph) 129,15; 128,82; 128,06 (Ph), 122,29 (C-3'), 111,68 (Cq, i-Prop), 104,97 (C-1), 82,36 (C-2), 82,07 (C-3), 78,92 (C-4), 71,75 (C-1'), 67,68 (C-5), 63,90 (C-1'), 54,20 (CH₂, Bn), 31,93; 29,68; 29,65; 29,62; 29,50; 29,37; 26,08 (C-3'',4'', 5'', 6'', 7'', 8'', 9'',10'', 11'') 26,75; 26,26 (2CH₃, i-Prop), 22,70 (C-12'') ppm. **HRMS**: calcd. para C₃₀H₄₇N₃O₅ [M + H]⁺ 530.3588; experimental 530.3594. calcd. para C₃₀H₄₇N₃O₅ [M + Na]⁺ 552.3408; experimental 552.3421.

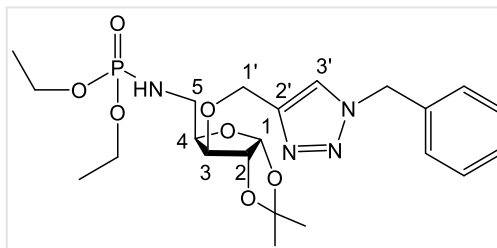


4.1.14. Síntese do composto 40 - 3-*O*-(1-Benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil-5-desoxi-5-(dietilfosfono)amino-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranose ou Dietil *N*-[3-*O*-(1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuran-5-il]fosforamidato

O composto **39** (0,03g, 0,078mmol), foi dissolvido em 5mL de DCM e foram adicionados 5equivalentes de trietil fosfito (0,07mL; 0,39mmol). A reação foi deixada sob atmosfera inerte,

agitação e a temperatura ambiente, durante 48h. Após o término da reação, verificado por TLC, o solvente foi evaporado e foi feita uma coluna de cromatografia de forma a purificar o composto, utilizando 20:1 AcOEt/MeOH como eluente. Foi obtido um óleo incolor com $\eta=97\%$.

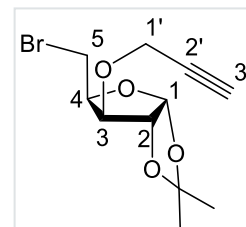
$R_f = 0,14$ (1:1, Hex/AcOEt); $[\alpha]_D^{20} = -3,6$ ($c=1$; CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,48$ (s, H-3', 1H), 7,39-7,38 (m, Ph, 3H), 7,30-7,28 (m, Ph, 2H), 5,89 (d, $J_{\text{H1},\text{H2}}=3,77$ Hz, 1H), 5,54 (s, $\text{CH}_2\text{-Bn}$, 2H), 4,79 (d, Parte A do sistema AB, $J_{\text{H1}'a,\text{H1}'b}=12,40$ Hz, H-1'a, 1H), 4,63-4,58 (m, H-1'b, H-2, 2H), 4,28 (td, $J_{\text{H4},\text{H5a,b}} = 6,71$ Hz, $J_{\text{H4},\text{H3}}=3,31$ Hz, H-4, 1H), 4,06-4,01 (m, 2 CH_2 , Et, H-3, 5H), 3,41-3,34 (m, NH, 1H), 3,24-3,14 (m, H-5, 2H), 1,48 (s, CH_3 , i-Prop, 3H), 1,32 (s, CH_3 , i-Prop, 3H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 144,47$ (C-2'), 134,39 (Cq, Ph), 129,16; 128,85; 128,16 (5C, Ph), 122,40 (C-3'), 111,74 (Cq, i-Prop), 105,03 (C-1), 82,04 (C-2), 81,92 (C-3), 79,69 (d, $J_{\text{C,P}}=5,07$ Hz, C-4), 63,07 (C-1'), 62,41-62,32 (m, 2 CH_2 , Et), 54,25 (CH_2 , Bn), 39,64 (C-5), 26,77; 26,23 (2 CH_3 , i-Prop), 16,25; 16,18 (2 CH_3 , Et) ppm. $^{31}\text{P-RMN}$ (142 MHz, CDCl_3): $\delta = 9,10$ ppm. **HRMS**: calcd. para $\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_7\text{P}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 497.2160; experimental 497.2176; calcd. para $\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_7\text{P}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 519.1979; experimental 519.1990.



4.1.15. Síntese do composto 41 - 5-bromo-5-desoxi-3-O-propargil-1,2-O-isopropilideno- α -D-xilofuranose

O composto **14** (0,1g, 0,438mmol) foi dissolvido em 10mL de DCM e foram adicionados 2 equivalentes de tetrabromometano (0,292g; 0,88mmol) e 2equivalentes de trifenilfosfina (0,230g; 0,88mmol). A mistura reacional foi deixada sob agitação, durante 24h e sob atmosfera inerte. A reação foi verificada por TLC (1:1, hexano/AcOEt), o solvente foi evaporado e foi feita uma coluna de cromatografia de forma a purificar o composto (5:1, hexano/AcOEt). Foram obtidos 30mg de um óleo incolor ($\eta=23\%$).

$R_f = 0,86$ (2:1, Hex/AcOEt); $[\alpha]_D^{20} = -37$ ($c=1$; CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5,95$ (d, $J_{\text{H1},\text{H2}}=3,81$ Hz, H-1, 1H), 4,71 (d, $J_{\text{H2},\text{H1}}=3,80$ Hz, H-2, 1H), 4,51-4,46 (m, H-4, 1H), 4,32 (s, H-1', 2H), 4,20 (d, $J_{\text{H3},\text{H4}}=3,10$ Hz, H-3, 1H), 3,57-3,49 (m, H-5, 2H), 2,53 (m, H-3', 1H), 1,54 (s, CH_3 , i-Prop, 3H), 1,35 (s, CH_3 , i-Prop, 3H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 112,13$ (Cq, i-Prop), 105,44 (C-1), 81,13 (C-2), 80,92 (C-3), 80,22 (C-4), 75,43 (C-2'), 58,10 (C-1'), 26,86 (CH_3 , i-Prop), 26,75 (C-5), 26,29 (CH_3 , i-Prop) ppm. **HRMS**: calcd. para $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{BrO}_4$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 313.0046; experimental 313.0040.



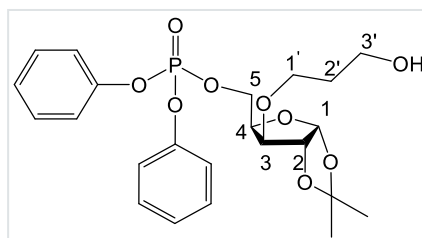
4.1.16. Procedimento geral da hidroboração-oxidação

O composto foi dissolvido em THF ($c \sim 0,2$), a solução foi arrefecida a 0°C e foram adicionados 1equivalentes de NaBH_4 e 1,2equivalentes de BF_3EtO_2 gota a gota. A reação foi aquecida a 30°C e deixada sob agitação e atmosfera inerte (N_2), durante 2h. Foi verificado por TLC a formação do intermediário. A mistura reacional foi colocada à temperatura ambiente e posteriormente arrefecida a 0°C , tendo sido adicionada, gota a gota, 2mL de uma solução de 5%NaOH aquoso e H_2O_2 (30%, 2mL). A mistura foi deixada sob agitação durante 1h, à temperatura ambiente. Após o término da reação, verificado por TLC, foi adicionado água e fez-se uma extração com AcOEt (3x). A fase orgânica foi secada com sulfato de magnésio anidro e após filtração, o AcOEt foi evaporado e foi feita uma coluna de cromatografia.

4.1.16.1. Síntese do composto 43 - Difenil [5-desoxi-3-*O*-(3-hidroxi-*prop*-1-il)-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranos-5-il]fosfato ou 3-*O*-(3-hidroxi-*prop*-1-il)-1,2-*O*-isopropilideno-5-*O*-difenilfosfono- α -D-xilofuranose

O composto foi sintetizado tendo em conta o procedimento descrito em 4.1.16., partindo do composto **32** (0,1g, 0,37mmol). Foi feita uma coluna de cromatografia (eluente hexano/AcOEt, 1:1). O composto desejado foi obtido com um rendimento de 35% (óleo incolor).

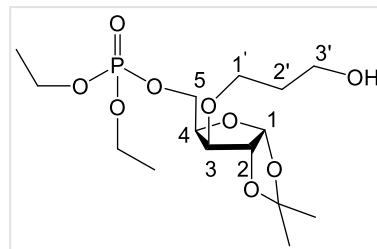
$R_f = 0,25$ (1:1, Hex/AcOEt); $[\alpha]_D^{20} = -8$ ($c=1$; CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,38\text{--}7,20$ (m, 2Ph, 10H), 5,90 (d, $J_{\text{H1,H2}}=3,78$ Hz, 1H), 4,60–4,54 (m, H-2, H-5'a, 2H), 4,43–4,34 (m, H-5'b, H-4, 2H), 3,81 (d, $J_{\text{H3,H2}}=2,85$ Hz, H-3, 1H), 3,76–3,61 (m, H-3'a, H-3'b, H-1'a, 3H), 3,54–3,48 (m, H-1'b, 1H), 1,78–1,70 (m, H-2', 2H), 1,49 (s, CH_3 , i-Prop, 3H), 1,33 (s, CH_3 , i-Prop, 3H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 150,40, 150,30$ (Cq, 2Ph), 129,87, 125,55, 120,07 (2Ph), 112,02 (Cq, i-Prop), 105,15 (C-1), 81,96 (C-2), 81,60 (C-3), 78,36 (d, $J_{\text{C,P}}=8,76$ Hz, C-4), 67,22 (C-1'), 65,25 (d, $J_{\text{C,P}}=5,57$ Hz, C-5), 59,21 (C-3'), 32,36 (C-2'), 26,84, 26,26 (2 CH_3 , i-Prop) ppm.



4.1.16.2. Síntese do composto 44 – Dietil [5-desoxi-3-*O*-(3-hidroxi-*prop*-1-il)-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranos-5-il]fosfato ou 3-*O*-(3-hidroxi-*prop*-1-il)-1,2-*O*-isopropilideno-5-*O*-difenílfosfono- α -D-xilofuranose

O composto foi sintetizado tendo em conta o procedimento descrito em 4.1.16., partindo do composto **35** (0,34g; 0,93mmol). Foi feita uma coluna de cromatografia (eluente AcOEt/Hexano, 6:1). O composto desejado foi obtido com um rendimento de 40% (óleo incolor).

$R_f = 0,35$ (1:6, Hex/AcOEt); $[\alpha]_D^{20} = -4$ ($c=1$; CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 5,91$ (d, $J_{H1,H2}=3,75$ Hz, H-1, 1H), 4,61 (d, $J_{H2,H1}=3,45$ Hz, H-2, 1H), 4,42-4,36 (m, H-5a, H-5b, 2H), 4,18-4,11 (m, H-4, 2CH₂-Et, 5H), 3,89 (m, , H-3, 1H), 3,84-3,72 (m, H-1'a, H-1'b, 2H), 3,70-3,63 (m, H-3'a, H-3'b, 2H), 1,82-1,78 (m, H-2', 2H), 1,51 (s, CH₃-i-Prop, 3H), 1,38-1,32 (m, CH₃-i-Prop, 2CH₃-Et, 9H) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 111,95$ (Cq, i-Prop), 105,12 (C-1), 82,02 (C-2), 81,60 (C-3), 78,53 (d, $J_{C,P}=8,99$ Hz, C-4), 67,09 (C-1'), 64,23 (d, $J_{C,P}=1,79$ Hz, CH₂, Et), 64,17 (d, $J_{C,P}=1,79$ Hz, CH₂, Et), 63,64 (d, $J_{C,P}=5,12$ Hz, C-5), 58,91 (C-3'), 32,41 (C-2'), 26,80; 26,24 (2CH₃, i-Prop), 16,15; 16,09 (2CH₃, Et) ppm.



4.1.17. Procedimento geral da ciclização térmica

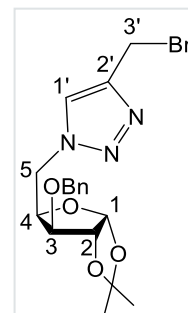
O composto foi dissolvido em tolueno ($c \sim 0,2$), tendo sido posteriormente adicionado 2equivalentes de brometo de propargilo, no caso dos composto **45-48**, e de propargilamina, no caso dos compostos **52-55**. A mistura reacional foi aquecida a 110°C e deixada durante a noite, sob agitação e atmosfera inerte. Após o término da reação que foi verificado por TLC, o tolueno foi evaporado e foi feita uma coluna de cromatografia de modo a purificar e separar os regioisómeros.

4.1.17.1. Síntese dos regioisómeros 45 e 46

Os compostos foram obtidos de acordo com o procedimento descrito em 4.1.17., partindo do composto **17** (0,159g; 0,52mmol). Foi feita uma coluna de cromatografia utilizando como eluente 8:1, ciclo-hexano/AcOEt e obteve-se os compostos **45** (cristais brancos) e **46** (óleo amarelado) com rendimentos de 48% e 2%, respetivamente.

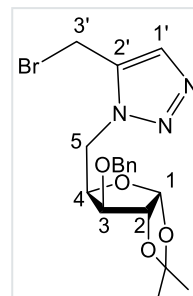
3-*O*-Benzil-5-(4-bromometil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranose ou 4-bromometil-1-(3-*O*-benzil-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranos-5-il)-1*H*-1,2,3-triazole (45)

R_f = 0,68 (4:1 Hexano/AcOEt); p.f. = 122,2°C-123,7°C; $[\alpha]_D^{20}$ = -19 ($c=1$; CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,60 (s, H-1', 1H), 7,42-7,34 (m, Ph, H-5), 6,00 (d, $J_{H1,H2}=3,68$ Hz, H-1, 1H), 4,76 (d, Parte A do sistema AB, $J_{Ha,Hb}=11,75$ Hz, CH₂, Bn, 1H), 4,70 (d, $J_{H2,H1}=3,60$ Hz, H-2, 1H), 4,69-4,63 (m, H-5a, 1H), 4,58-4,48 (m, H-4, H-5b, H-3', 4H), 4,51-4,48 (d, Parte B do sistema AB, CH₂, Bn, 1H), 4,00 (d, $J_{H3,H4}=2,73$ Hz, H-3, 1H), 1,44 (s, CH₃, i-Prop, 3H), 1,33 (s, CH₃, i-Prop, 3H) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 144,90 (C-2'), 136,75 (Cq, Ph), 128,77, 128,43, 128,05 (Ph), 123,97 (C-1'), 112,18 (Cq, i-Prop), 105,25 (C-1), 81,92 (C-2), 81,46 (C-3), 78,71 (C-4), 71,97 (CH₂, Bn), 49,40 (C-5), 26,74, 26,71 (2CH₃, i-Prop), 21,73 (C-3')ppm. **HRMS**: calcd. para C₁₈H₂₂BrN₃O₄ [$M + H$]⁺ 424.0866; experimental 424.0867.



3-*O*-Benzil-5-(5-bromometil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranose ou 5-bromometil-1-(3-*O*-benzil-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranos-5-il)-1*H*-1,2,3-triazole (46)

R_f = 0,50 (4:1 Hexano/AcOEt); $[\alpha]_D^{20}$ = -26 ($c=1$; CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7,68 (s, H-1', 1H), 7,40-7,37 (m, Ph, H-5), 6,00 (d, $J_{H1,H2}=3,68$ Hz, H-1, 1H), 4,79-4,47 (m, H-4, H-5, H-3', H-2, CH₂, Bn, 8H), 4,09 (s, H-3, 1H), 1,43 (s, CH₃, i-Prop, 3H), 1,32 (s, CH₃, i-Prop, 3H) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 136,79 (C-2'), 134,10 (Cq, Ph), 133,94 (C-1'), 128,73, 128,38, 127,95 (Ph), 112,21 (Cq, i-Prop), 105,19 (C-1), 82,03 (C-2), 81,67 (C-3), 79,44 (C-4), 72,03 (CH₂, Bn), 47,70 (C-5), 26,69; 26,20 (2CH₃, i-Prop), 17,34 (C-3')ppm.

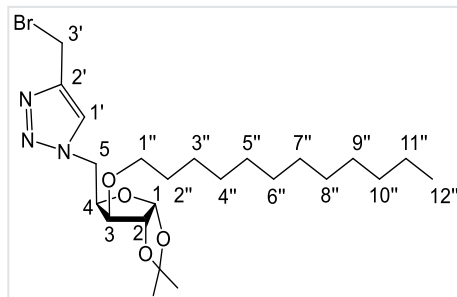


4.1.17.2 Síntese dos regioisômeros 47 e 48

Os compostos foram obtidos de acordo com o procedimento descrito em 4.1.17., partindo do composto **18** (0,3g; 0,98mmol). Foi feita uma coluna de cromatografia utilizando como eluente 7:1, ciclo-hexano/AcOEt e obteve-se os compostos **47** e **48** (óleos amarelados) com rendimentos respectivos de 46% e 5%.

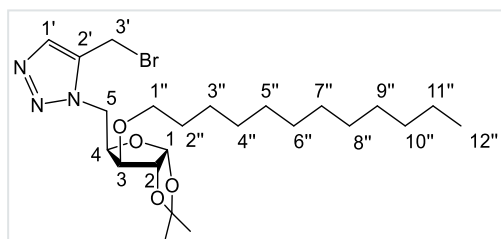
5-(4-bromometil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-desoxi-3-*O*-dodecil-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranose ou 4-bromometil-1-(5-desoxi-3-*O*-dodecil-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranos-5-il)-1*H*-1,2,3-triazole (47)

$R_f = 0,25$ (6:1 Hex/AcOEt); $[\alpha]_D^{20} = -12$ ($c=1$; CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,73$ (s, H-1', 1H), 5,97 (d, $J_{\text{H}1,\text{H}2}=3,67$ Hz, H-1, 1H), 4,72 (dd, $J_{\text{H}5\text{a},\text{H}5\text{b}}=14,28$ Hz, $J_{\text{H}5\text{a},\text{H}4}=3,10$ Hz, H-5a, 1H), 4,61 (d, $J_{\text{H}2,\text{H}3}=3,64$ Hz, H-2, 1H), 4,59-4,47 (m, H-4, H-5b, H-3', 4H), 3,86 (d, $J_{\text{H}3,\text{H}2}=2,72$ Hz, H-2, 1H), 3,68-3,63 (dt, $J_{\text{H}-1''\text{a},\text{H}-1''\text{b}}=15,61$ Hz, H-1''a, 1H), 4,48 (dd, H-5b, 1H), 3,43 (dt, $J_{\text{H}-1''\text{a},\text{H}2''}=J_{\text{H}-1''\text{b},\text{H}2''}=6,62$ Hz, H-1''b, 1H), 1,61-1,56 (m, H-2'', 2H), 1,44 (s, CH_3 , i-Prop, 3H), 1,32-1,27 (m, CH_3 -i-Prop, H-3'', H-4'', H-5'', H-6'', H-7'', H-8'', H-9'', H-10'', H-11'', 21H), 0,89 (t, $J_{\text{H}-12'',\text{H}-11''\text{a}}=J_{\text{H}-12'',\text{H}-11''\text{b}}=6,96$ Hz, 3H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 144,58$ (C-2'), 123,99 (C-1'), 112,08 (Cq, i-Prop), 105,24 (C-1), 82,45 (C-2), 81,96 (C-3), 78,80 (C-4), 70,51 (C-1'), 49,47 (C-5), 31,92; 29,66; 29,57; 29,36; 26,91; 26,11; 22,10 (C-2'', 3'', 4'', 5'', 6'', 7'', 8'', 9'', 10'', 11''), 26,75; 26,20 (2 CH_3 , i-Prop), 14,15 (C-3'') ppm. **HRMS**: calcd. para $\text{C}_{23}\text{H}_{40}\text{BrN}_3\text{O}_4$ [$M + \text{H}$] $^+$ 502.2275; experimental 502.2277.



5-(5-bromometil-1H-1,2,3-triazol-1-il)-5-desoxi-3-O-dodecil-1,2-O-isopropilideno-α-D-xilofuranose ou 5-bromometil-1-(5-desoxi-3-O-dodecil-1,2-O-isopropilideno-α-D-xilofuranos-5-il)-1H-1,2,3-triazole (48)

$R_f = 0,16$ (6:1 Hex/AcOEt); $[\alpha]_D^{20} = -50$ ($c=1$; CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,67$ (s, H-1', 1H), 5,94 (d, $J_{\text{H}1,\text{H}2}=3,70$ Hz, H-1, 1H), 4,75-4,72 (m, H-5a, H-3', 2H), 4,61-4,51 (m, H-4, H-5b, H-3'b, H-2, 4H), 3,95 (s, H-2, 1H), 3,66 (dt, $J_{\text{H}-1''\text{a},\text{H}-1''\text{b}}=15,48$ Hz, H-1''a, 1H), 3,45 (dt, $J_{\text{H}-1''\text{a},\text{H}2''}=J_{\text{H}-1''\text{b},\text{H}2''}=6,78$ Hz, H-1''b, 1H), 1,61-1,56 (m, H-2'', 2H), 1,41 (s, CH_3 , i-Prop, 3H), 1,30-1,26 (m, CH_3 -i-Prop, H-3'', H-4'', H-5'', H-6'', H-7'', H-8'', H-9'', H-10'', H-11'', 21H), 0,87 (t, $J_{\text{H}-12'',\text{H}-11''\text{a}}=J_{\text{H}-12'',\text{H}-11''\text{b}}=6,96$ Hz, 3H) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 139,36$ (C-1'), 133,41 (C-1'), 112,09 (Cq, i-Prop), 105,16 (C-1), 82,60 (C-2), 82,08 (C-3), 79,59 (C-4), 70,50 (C-1'), 47,69 (C-5), 31,92; 29,67; 29,36; 26,91; 26,08; 22,10 (C-2'', 3'', 4'', 5'', 6'', 7'', 8'', 9'', 10'', 11''), 26,70; 26,20 (2 CH_3 , i-Prop), 14,15 (C-3'') ppm. **HRMS**: calcd. para $\text{C}_{23}\text{H}_{40}\text{BrN}_3\text{O}_4$ [$M + \text{H}$] $^+$ 502.2275; experimental 502.2276.



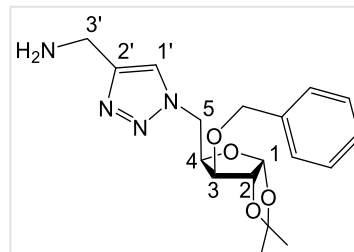
4.1.17.2. Síntese dos regioisômeros 52 e 53

Os compostos foram obtidos de acordo com o procedimento descrito em 4.1.17., partindo do composto **17** (0,6g; 1,37mmol). Foi feita uma coluna de cromatografia começando com AcOEt de forma a remover primeiro o produto de partida (0,480g) e aumentando a polaridade até 18:1,

AcOEt/MeOH, obtendo-se os compostos **52** e **53** (óleos acastanhados) com o mesmo rendimento de 4%.

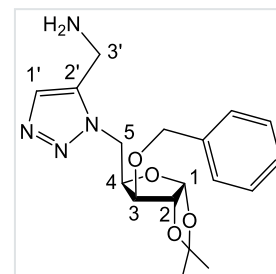
3-*O*-Benzil-5-(4-aminometil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranose ou 4-Aminometil-1-(3-*O*-benzil-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranos-5-il)-1*H*-1,2,3-triazole (52**)**

$R_f = 0,23$ (16:1, AcOEt/MeOH); $[\alpha]_D^{20} = -12$ ($c=1$; CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7,64$ (s, H-1', 1H), 7,39-7,36 (m, Ph, 5H), 5,98 (d, $J_{H1,H2}=3,331$ Hz, H-1, 1H), 5,27 (s, NH₂, 2H), 4,75-4,72 (m, CH₂, Bn, 2H), 4,70-4,64 (m, H-5a, 1H), 4,68 (d, $J_{H2,H1}=3,34$ Hz, H-2, 1H) 4,57-4,51 (m, CH₂, Bn; H-5b, H-4, 3H), 4,05-4,01 (m, H-3', H'3, 3H), 1,43 (s, CH₃, i-Prop, 3H), 1,31 (s, CH₃, i-Prop, 3H) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 146,80$ (C-2'), 136,86 (Cq, Ph), 128,71; 128,33; 127,99 (5C, Ph), 122,85 (C-1'), 111,13 (Cq, i-Prop), 105,20 (H-1), 81,97 (C-3), 81,54 (C-2), 78,89 (C-4), 71,96 (CH₂, Bn), 49,33 (C-5), 36,68 (C-2'), 26,71; 26,19 (2CH₃, i-Prop) ppm. HRMS: calcd. para C₁₈H₂₄N₄O₄ [M + H]⁺ 361.1870; experimental 361.1870; calcd. for C₁₈H₂₄N₄O₄ [M + Na]⁺ 383.1690; experimental 383.1690.



3-*O*-Benzil-5-(5-aminometil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranose ou 5-Aminometil-1-(3-*O*-benzil-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranos-5-il)-1*H*-1,2,3-triazole (53**)**

$R_f = 0,31$ (16:1, AcOEt/MeOH); $[\alpha]_D^{20} = -12$ ($c=1$; CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7,58$ (s, H-1', 1H), 7,41-7,35 (m, Ph, 5H), 5,99 (d, $J_{H1,H2}=3,67$ Hz, H-1, 1H), 4,75 (d, Parte A do sistema AB, $J_{Ha,Hb}=11,68$ Hz, CH₂, Bn, 2H), 4,69-4,62 (m, H-5a, H-4, H-2, 3H), 4,55-4,49 (m, CH₂, Bn, H-5b, 2H), 4,10 (d, $J_{H3,H4}=3,07$ Hz, H-3, 1H), 4,00-3,92 (m, H-3', 2H), 1,43 (s, CH₃, i-Prop, 3H), 1,32 (s, CH₃, i-Prop, 3H) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 139,15$ (C-2'), 136,87 (Cq, Ph), 132,25 (C-1'), 128,70; 128,35; 127,98 (5C, Ph), 111,12 (Cq, i-Prop), 105,14 (H-1), 81,98 (C-3), 81,85 (C-2), 79,69 (C-4), 72,03 (CH₂, Bn), 47,34 (C-5), 34,90 (C-2'), 26,81; 26,22 (2CH₃, i-Prop) ppm.



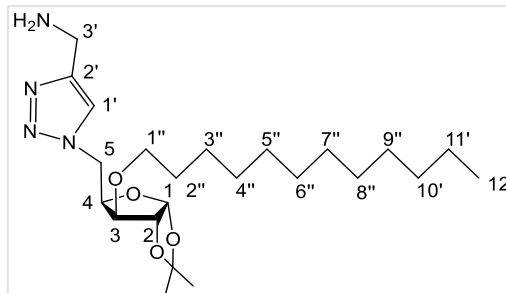
4.1.17.3. Síntese dos regioisômeros **54** e **55**

Os compostos foram obtidos de acordo com o procedimento descrito em 4.1.17., partindo do composto **17** (0,6g; 1,56mmol). Foi feita uma coluna de cromatografia começando com AcOEt de forma a remover primeiro o produto de partida (0,239g) e aumentando a polaridade até 18:1,

AcOEt/MeOH, obtendo-se os compostos **54** e **55** (óleos acastanhados) com o mesmo rendimento de 25%.

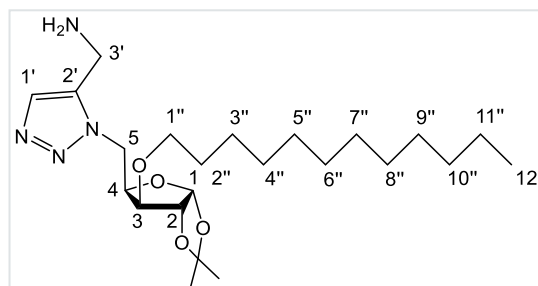
3-*O*-Dodecil-5-(4-aminometil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranose ou 4-Aminometil-1-(3-*O*-dodecil-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranos-5-il)-1*H*-1,2,3-triazole (54**)**

$R_f = 0,23$ (16:1, AcOEt/MeOH); $[\alpha]_D^{20} = -45$ (c=1; CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7,61$ (s, H-1', 1H), 5,90 (d, $J_{H1,H2}=3,91$ Hz, H-1, 1H), 5,27 (s, NH₂, 2H), 4,68-4,65 (m, Parte B do sistema ABX, H-5a, 1H) 4,56 (d, $J_{H2,H1}=3,55$ Hz, H-2, 1H), 4,50-4,41 (m, H-5b, H-4, 2H), 3,97 (s, H-3', 2H), 3,83 (d, H-3, 1H), 3,60 (dt, $J_{H1''a,H1''b}=15,74$ Hz, H-1''a, 1H), 3,40 (dt, $J_{H1''a,H2''}=J_{H1''b,H2''}=6,32$ Hz, H-1''b, 1H), 1,57-1,51 (m, H-2'', 2H), 1,38 (s, CH₃, i-Prop, 3H), 1,26-1,22 (m, CH₃-i-Prop, H-3'',4'',5'',6'',7'',8'',9'',10'',11'', 21H), 0,83 (t, $J_{H12'',H11''a}=J_{H12'',H11''b}=6,95$ Hz, 3H) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 147,78$ (C-2'), 122,35 (C-1'), 111,92 (Cq, i-Prop), 105,15 (H-1), 82,44 (C-3), 81,96 (C-2), 78,96 (C-4), 70,45 (C-1''), 49,26 (C-5), 36,90 (C-2'), 31,86; 29,60; 29,52; 29,36; 29,30; 26,05 (C-2'',3'',4'',5'',6'',7'',8'',9'',10'',11''), 26,68; 26,13 (2CH₃, i-Prop), 22,63 (C-12'')ppm. HRMS: calcd. para C₂₃H₄₂N₄O₄ [M + H]⁺ 439.3279; experimental 439.3280.



3-*O*-Dodecil-5-(5-aminometil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranose ou 5-Aminometil-1-(3-*O*-dodecil-5-desoxi-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranos-5-il)-1*H*-1,2,3-triazole (55**)**

$R_f = 0,51$ (16:1, AcOEt/MeOH); $[\alpha]_D^{20} = -10$ (c=1; CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7,60$ (s, H-1', 1H), 5,95 (d, $J_{H1,H2}=3,54$ Hz, H-1, 1H), 4,70 (dd, Parte A do sistema ABX, $J_{H5a,H5b}=14,35$ Hz, H-5a, 1H), 4,66-4,63 (m, H-4, 1H), 4,61 (d, $J_{H2,H1}=3,68$ Hz, H-2, 1H), 4,47 (dd, Parte B do sistema ABX, $J_{H4,H5b}=3,23$ Hz, H-5b, 1H), 4,01 (s, H-3', 2H), 3,96 (d, $J_{H3,H4}=3,19$ Hz, 1H), 3,67 (dt, $J_{H1''a,H1''b}=15,74$ Hz, H-1''a, 1H), 3,46 (dt, $J_{H1''b,H2''}=6,32$ Hz, H-1''a, 1H), 1,65-1,56 (m, H-2'', 2H), 1,43 (s, CH₃, i-Prop, 3H), 1,31-1,27 (m, CH₃-i-Prop, H-3'',4'',5'',6'',7'',8'',9'',10'',11'', 21H), 0,89 (t, $J_{H12'',H11''a}=J_{H12'',H11''b}=6,98$ Hz, 3H)ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 139,08$ (C-2'), 132,28 (C-1'), 112,04 (Cq, i-Prop), 105,12 (C-1), 82,72 (C-3), 82,03 (C-2), 79,81 (C-4), 70,56 (C-1''), 47,32 (C-5), 34,90 (C-3'), 31,92; 29,66; 29,64; 29,41; 29,36; 26,97; 22,70 (C-2'',3'',4'',5'',6'',7'',8'',9'',10'',11''), 26,71; 26,21; (2CH₃, i-Prop), 14,14 (C-12'') ppm. HRMS: calcd. para C₂₃H₄₂N₄O₄ [M + H]⁺ 439.3279; experimental 439.3280.



4.1.18. Procedimento geral para a Arbuzov

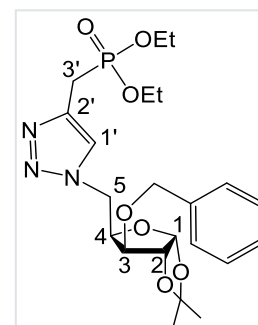
O precursor contendo (bromometil)triazole foi dissolvido em cerca de 1,5mL de fosfito de trietilo. A mistura reacional foi aquecida a 110°C e deixada sob agitação durante 2h. O término da reação foi verificado por TLC. Foi feita uma coluna de cromatografia de modo a purificar obter o produto desejado puro, utilizando misturas de éter de petróleo/AcOEt de forma a que o fosfito de trietilo saísse primeiro e por fim, o composto desejado.

4.1.18.1. Síntese dos compostos 49, 50 e 51

Os compostos **49**, **50** e **51** foram sintetizados de acordo com o procedimento **4.1.18.**, partindo dos compostos **44** (0,08g; 0,16mmol), **46** (0,085g; 0,17mmol) e **47** (0,09g; 0,18mmol), respectivamente. Para o composto **49** foi feita uma coluna de cromatografia utilizando misturas de éter de petróleo/AcOEt, começando com 4:1 para remover primeiro o trietil fosfito e aumentando a polaridade para 1:1. Para os compostos **50** e **51** foi feita uma coluna de cromatografia utilizando misturas de éter de petróleo/AcOEt, começando com 5:1 para também ser possível remover primeiro o trietil fosfito e aumentando a polaridade para 2:1. Os compostos foram obtidos com um rendimento de 98% (**49**), 96% (**50**) e 75% (**51**), sob a forma de óleos incolores.

3-O-Benzil-5-desoxi-5-[4-(dietilfosfono)metil-1H-1,2,3-triazol-1-il]-1,2-O-isopropilideno- α -D-xilofuranose ou **Dietil {[1-(3-O-benzil-5-desoxi-1,2-O-isopropilideno- α -D xilofuranos-5-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metil}fosfonato (**49**)**

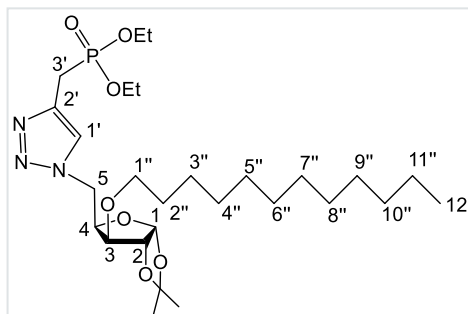
$R_f = 0,19$ (3:1, Hex/AcOEt); $[\alpha]_D^{20} = -33$ (c=1; CH₂Cl₂); **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7,67$ (s, H-1', 1H), 7,42-7,35 (m, Ph, 5H), 5,98 (d, $J_{H1,H2}=3,65$ Hz, 1H), 4,75 (d, Parte A do sistema AB, $J_{Ha,Hb}=11,61$ Hz, CH₂, Bn, 1H), 4,68-4,64 (m, H-b, CH₂, Bn, H-5a, 2H), 4,57-4,52 (m, Parte B do sistema ABX, H-5b, H-4, 2H), 4,10 (m, 2CH₂, Et, 4H), 4,00 (d, $J_{H3,H4}=2,45$ Hz, H-3, 1H), 3,41-3,26 (m, $J_{H3'a,H3'b}=20,30$ Hz, $J_{H,P}=15,68$ Hz, H-3', 2H), 1,61-1,56 (m, CH₂-2'', 2H), 1,43 (s, CH₃, i-Prop, 3H), 1,32-1,28 (m, CH₃-i-prop, 2CH₃-Et, 9H) ppm. **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 138,40$ (d, $J_{C,P}=7,22$ Hz, C-2'), 136,83 (Cq, i-Prop), 128,70; 128,32; 127,93 (5C, Ph), 123,83 (d, $J_{C,P}=4,23$ Hz C-1'), 112,08 (Cq, i-Prop), 105,21 (C-1), 81,96 (C-3), 81,52 (C-2), 78,83 (C-4), 71,97 (C-1''), 63,40 (d, $J_{C,P}=3,75$ Hz, CH₂, Et), 63,34 (d, $J_{C,P}=3,76$ Hz, CH₂, Et), 49,36 (C-5), 26,71;26,21 (2CH₃, i-Prop), 24,17 ($J_{C,P}=143,40$ Hz, C-3'), 16,37 ($J_{C,P}=6,20$ Hz, 2CH₃, Et) ppm. **³¹P-RMN** (142 MHz, CDCl₃): $\delta = 25,13$ ppm.



HRMS: calcd. para $C_{22}H_{32}N_3O_7P$ $[M + H]^+$ 482.2051; experimental 482.2063; calcd. para $C_{22}H_{32}N_3O_7P$ $[M + Na]^+$ 504.1870; experimental 504.1873.

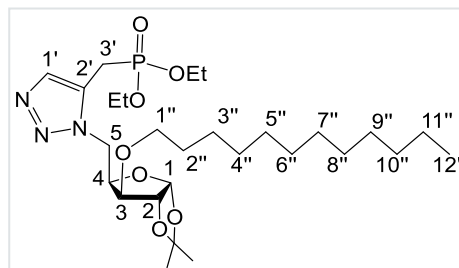
5-desoxi-5-[4-(dietilfosfono)metil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il]-3-*O*-dodecil-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranose ou Dietil {[1-(5-desoxi-3-*O*-dodecil-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranos-5-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metil}fosfonato (50)

$R_f = 0,19$ (3:1, Hex/AcOEt); $[\alpha]_D^{20} = -14$ ($c=1$; CH_2Cl_2); 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7,71$ (s, H-1', 1H), 5,95 (d, $J_{H1,H2}=3,64$ Hz, 1H), 4,74-4,67 (dd, Parte A do sistema ABX, $J_{H5a,H5b}=17,36$ Hz, $J_{H5a,H4}=7,97$ Hz, H-5a, 1H), 4,60 (d, $J_{H2,H3}=3,86$ Hz, H-2, 1H), 4,54-4,48 (m, H-5b, H-4, 2H), 4,10 (m, 2CH₂-Et, 4H), 3,84 (d, $J_{H3,H4}=2,45$ Hz, H-3, 1H), 3,65 (dt, $J_{H1''a,H1''b}=15,65$ Hz, H-1''a, 1H), 3,44 (dt, $J_{H1''a,H2''}=J_{H1''b,H2''}=6,58$ Hz, H-1''b, 1H), 3,41-3,26 (m, $J_{H3'a,H3'b}=20,30$ Hz, $J_{H,P}=15,68$ Hz, H-3', 2H), 1,61-1,56 (m, CH₂-2'', 2H), 1,43 (s, CH₃, i-Prop, 3H), 1,31-1,27 (m, CH₃-i-Prop, CH₂-3'', 4'', 5'', 6'', 7'', 8'', 9'', 10'', 11'', 2CH₃-Et, 27H), 0,88 (t, $J_{H12'',H11''a}=J_{H-12'',H11''b}=6,98$ Hz, 3H)ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 138,36$ (d, $J_{C,P}=7,53$ Hz C-2'), 123,80 ($J_{C,P}=3,38$ Hz, C-1'), 111,98 (Cq, i-Prop), 105,19 (C-1), 82,39 (C-3), 81,99 (C-2), 78,92 (C-4), 70,50 (C-1''), 63,45 (d, $J_{C,P}=2,35$ Hz, 2CH₂, Et), 63,38 (d, $J_{C,P}=2,35$ Hz, 2CH₂, Et), 49,30 (C-5), 26,21, 26,11 (2CH₃, i-Prop), 24,15 ($J_{C,P}=142,43$ Hz, C-3'), 31,91; 29,65; 29,62; 29,58; 29,43; 29,35; 26,73; 22,69 (C-3'',4'',5'',6'',7'',8'',9'',10'',11''), 29,69 (C-2''), 16,40;16,34 (d, $J_{C,P}=6,01$ CH₃, Et), 14,13 (C-12'')ppm. ^{31}P -RMN (142 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 25,13$ ppm. **HRMS:** calcd. para $C_{27}H_{50}N_3O_7P$ $[M + H]^+$ 560.3459; experimental 560.3462;



5-desoxi-5-[5-(dietilfosfono)metil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il]-3-*O*-dodecil-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranose ou Dietil {[1-(5-desoxi-3-*O*-dodecil-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranos-5-il)-1*H*-1,2,3-triazol-5-il]metil}fosfonato (51)

$R_f = 0,21$ (3:1, Hex/AcOEt); $[\alpha]_D^{20} = -18$ ($c=1$; CH_2Cl_2); 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7,62$ (s, H-1', 1H), 5,93 (d, $J_{H1,H2}=3,64$ Hz, 1H), 4,72-4,66 (m, H-5a, 1H), 4,59-4,55 (m, H-5b, H-4, H-2, 3H), 4,14-4,04 (m, 2CH₂-Et, 4H), 3,91 (d, $J_{H3,H4}=2,18$ Hz, H-3, 1H), 3,63 (dt, $J_{H1''a,H1''b}=15,62$ Hz, $J_{H1''a,H2''}=J_{H1''b,H2''}=6,63$ Hz, H-1''a, 1H), 3,52-3,45 (m, H-1''b, 1H), 3,42-3,26 (m, H-3', 2H), 1,60-1,56 (m, CH₂-2'', 2H), 1,40 (s, CH₃, i-Prop, 3H), 1,31-1,26 (m, CH₃-i-Prop, CH₂-3'', 4'', 5'', 6'', 7'', 8'', 9'', 10'', 11'', 2CH₃-Et, 27H), 0,88 (t, $J_{H-12'',H-11''a}=J_{H-12'',H-11''b}=6,99$ Hz, 3H)ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 133,88$ (d, $J_{C,P}=4,47$ Hz C-1'), 129,31 (d, $J_{C,P}=7,28$ Hz, C-2'), 111,96 (Cq, i-Prop), 105,11 (C-1), 82,66 (C-3), 81,96 (C-2), 79,96 (C-4),



70,51 (C-1''), 62,68 (d, $J_{C,P}=3,17$ Hz, 2CH₂, Et), 62,62 (d, $J_{C,P}=3,05$ Hz, 2CH₂, Et), 47,40 (C-5), 26,66, 26,18 (2CH₃, i-Prop), 31,90; 29,63; 29,57; 29,42; 29,35; 26,04; 22,68 (C-3'',4'',5'',6'',7'',8'',9'',10'',11''), 22,62 (C-2''), 22,29 ($J_{C,P}=144,08$ Hz, C-3'), 16,38;16,32 (d, $J_{C,P}=6,01$ CH₃, Et), 14,13 (C-12'')ppm. ³¹P-RMN (142 MHz, CDCl₃): 22,19ppm. **HRMS**: calcd. para C₂₇H₅₀N₃O₇P [M + H]⁺ 560.3459; experimental 560.3479; calcd. para C₂₇H₅₀N₃O₇P [M + Na]⁺ 582.3279; experimental 582.3295.

4.1.19. Procedimento geral para a síntese dos compostos contendo o sistema N-(triazolil)metil fosforamidato

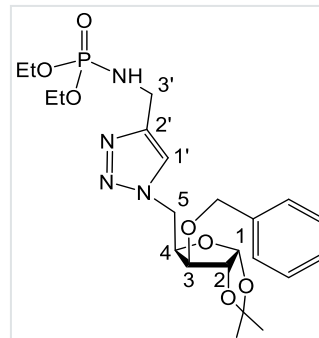
O precursor contendo (aminometil)triazole foi dissolvido em DCM (c~0,2), a mistura reacional foi arrefecida a 0°C e foram adicionados 1,5 equivalentes de clorofosfato de dietilo. A mistura reacional ficou sob agitação, à temperatura ambiente e em atmosfera inerte, durante 2h, tendo a reação sido acompanhada por TLC, utilizando como eluente 16:1, AcOEt/MeOH. Evaporou-se o solvente e foi efetuada uma coluna de cromatografia de forma a purificar o composto.

4.1.19.1. Síntese dos compostos 56, 57 e 58

Os compostos **56**, **57** e **58** foram sintetizados de acordo com o procedimento 4.1.19., partindo dos compostos **52** (0,03g; 0,05mmol), **54** (0,089g; 0,20mmol) e **53** (0,1545g, 0,35mmol) respetivamente. No caso do composto **56** foi feita uma coluna de cromatografia utilizando misturas de AcOEt e MeOH, começando com AcOEt e foi-se aumentado a polaridade para 25:1 e 18:1 AcOEt/MeOH. No caso dos compostos **57** e **58** foi feita uma coluna de cromatografia utilizando misturas de AcOEt e MeOH, começando com AcOEt apenas e aumentado a polaridade para 28:1 e 22:1 AcOEt/MeOH). Os compostos foram obtidos com um rendimento de 56% (**56**), 52% (**57**) e 52% (**58**), sob a forma de óleos incolores.

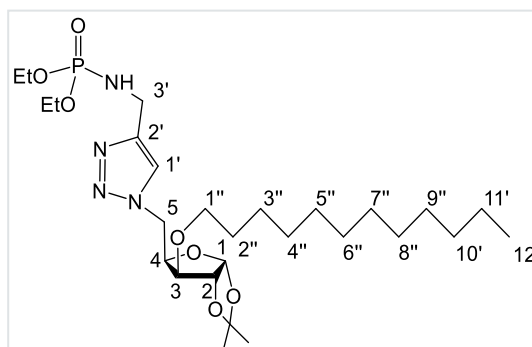
3-O-Benzil-5-desoxi-5-[4-(dietilfosfono)aminometil-1H-1,2,3-triazol-1-il]-1,2-O-isopropilideno-α-D-xilofuranose ou Dietil N-**{[1-(3-O-benzil-5-desoxi-1,2-O-isopropilideno-α-D-xilofuranos-5-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metil}fosforamidato** (**56**)

$R_f = 0,67$ (16:1, AcOEt/MeOH); $[\alpha]_D^{20} = -23$ ($c=1$; CH_2Cl_2); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,59$ (s, H-1', 1H), 7,43-7,35 (m, Ph, 5H), 5,99 (d, $J_{H1,H2}=3,93$ Hz, H-1, 1H), 4,76 (d, Parte A do sistema AB, $J_{Ha,Hb}=11,69$ Hz, CH_2 , Bn, 1H), 4,70-4,65 (m, Parte A do sistema ABX, H-5a, H-2, 2H), 4,56-4,51 (m, CH_2 , Bn, H-5b, H-4, 3H), 4,20 (dd, Parte A e B do sistema ABX, $J_{H3',NH}=6,95$ Hz, $J_{H-3'a,H3'b}=10,64$ Hz, H-3', 2H), 4,10-4,01 (m, 2CH_2 , Et, H-3, 5H), 3,87-3,85 (H-3), 3,19-3,12 (m, NH, 1H), 1,43 (s, CH_3 , i-Prop, 3H), 1,34-1,27 (m, CH_3 -i-Prop, 2CH_3 -Et, 11H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 146,55$ (d, $J_{C,P}=6,27$ Hz, C-2'), 136,77 (Cq, Ph), 128,74; 128,40; 127,98 (5C, Ph), 122,67 (C-1'), 112,11 (Cq, i-Prop), 105,23 (C-1), 81,95 (C-3), 81,57 (C-2), 78,85 (C-4), 71,98 (C-1''), 62,56 (d, $J_{C,P}=5,53$ Hz, 2CH_2 , Et), 49,46 (C-5), 36,92 (C-3'), 26,71; 26,19 (2CH_3 , i-prop) 16,24; 16,17 (2CH_3 , Et), 14,13 (C-12'') ppm. ^{31}P -RMN (142 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,19$ ppm. HRMS: calcd. para $\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_7\text{P}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 497.2160; experimental 497.2173; calcd. para $\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_7\text{P}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 519.1979; experimental 519.1997.



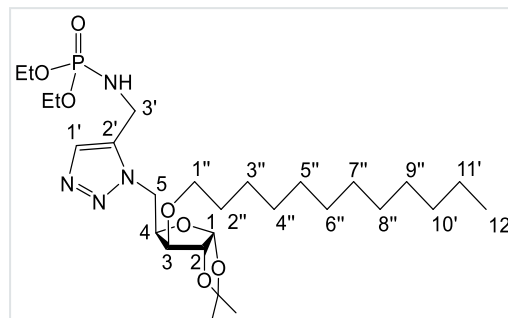
5-Desoxi-3-O-dodecil-5-[4-(dietilfosfono)aminometil-1H-1,2,3-triazol-1-il]-1,2-O-isopropilideno- α -D-xilofuranose ou Dietil N-[[1-(5-desoxi-3-O-dodecil-1,2-O-isopropilideno- α -D-xilofuranos-5-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metil}fosforamidato (57)

$R_f = 0,67$ (16:1, AcOEt/MeOH); $[\alpha]_D^{20} = -23$ ($c=1$; CH_2Cl_2); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,66$ (s, H-1', 1H), 5,96 (d, $J_{H1,H2}=3,80$ Hz, H-1, 1H), 4,76-4,68 (m, H-5'a, 1H), 4,61 (d, $J_{H2,H1}=3,80$ Hz, H-2, 1H), 4,53-4,45 (m, H-5'b, H-4, 2H), 4,23 (dd, parte A e B do sistema ABX, $J_{H-3',NH}=7,04$ Hz, $J_{H-3'a,H-3'b}=10,68$ Hz, H-3', 2H), 4,12-4,01 (m, 2CH_2 , Et, 4H), 3,87-3,85 (m, H-3, 1H), 3,65 (dt, $J_{H1''a,H1''b}=15,68$ Hz, H-1''a, 1H), 3,44 (dt, $J_{H1''b,H2''}=J_{H1''a,H2''}=6,62$ Hz, H-1''b, 1H), 3,18 (dt, $J_{NH,P}=13,17$ Hz, $J_{NH,H3'a}=J_{NH,H3'b}=6,48$ Hz, 1H), 1,61-1,56 (m, H-2'', 2H), 1,43 (s, CH_3 , i-Prop, 3H), 1,34-1,27 (m, CH_3 -i-Prop, 2CH_3 -Et, H-3'', H-4'', H-5'', H-6'', H-7'', H-8'', H-9'', H-10'', H-11'', 27H), 0,89 (t, $J_{H-12'',H-11'a}=J_{H-12'',H-11'b}=6,97$ Hz, 3H) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 146,59$ (d, $J_{C,P}=6,15$ Hz, C-2'), 122,64 (C-1'), 111,99 (Cq, i-Prop), 105,22 (C-1), 82,55 (C-3), 81,99 (C-2), 78,97 (C-4), 70,54 (C-1''), 62,53 (d, $J_{C,P}=6,15$ Hz, 2CH_2 , Et), 49,46 (C-5), 36,95 (C-3'), 31,91; 29,67; 29,65; 29,63; 29,57; 29,42; 29,35; 26,74; 22,69 (C-3'', 4'', 5'', 6'', 7'', 8'', 9'', 10'', 11'') 26,19; 26,10 (2CH_3 , i-prop) 16,23; 16,16 (2CH_3 , Et), 14,13 (C-12'') ppm. ^{31}P -RMN (142 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,19$ ppm. HRMS: calcd. para $\text{C}_{27}\text{H}_{51}\text{N}_4\text{O}_7\text{P}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 575.3568; experimental 575.3572; calcd. para $\text{C}_{27}\text{H}_{51}\text{N}_4\text{O}_7\text{P}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 597.3388; experimental 597.3390.



5-Desoxi-3-*O*-dodecil-5-[5-(dietilfosfono)aminometil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il]-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-xilofuranose ou Dietil *N*-{[1-(5-desoxi-3-*O*-dodecil-1,2-*O*-isopropilidene- α -D-xilofuranos-5-il)-1*H*-1,2,3-triazol-5-il]metil}fosforamidato (58)

$R_f = 0,61$ (16:1, AcOEt/MeOH); $[\alpha]_D^{20} = -16$ ($c=1$; CH₂Cl₂); **¹H NMR** (400 MHz, , CDCl₃): $\delta = 7,65$ (s, H-1', 1H), 5,95 (d, $J_{H1,H2}=3,79$ Hz, H-1, 1H), 4,73 (dd, Parte A do sistema ABX, $J_{H5'a,H5'b}=14,88$ Hz, $J_{H5a,H-4}=2,83$ Hz, H-5a, 2H), 4,61 (d, $J_{H2,H1}=3,65$ Hz, H-2, 1H, 4,58-4,55 (m, H-4, 1H), 4,45-4,40 (Parte B do sistema ABX, m, H-5b, 1H), 4,31 (dt, H-3'a, $J_{H-3'a,H-3'b} = 15,68$ Hz, $J_{NH,H-3'a} = J_{P,H-3'a} = 10,1$ Hz, 1H), 4,19 (ddd, $J_{NH,H-3'b} = 5,62$ Hz, $J_{P,H-3'b} = 12,04$ Hz, H-3'b, 1H), 4,11-3,97 (m, 2CH₂, Et, 4H), 3,65 (dt, $J_{H-1''a,H-1''b}=15,86$ Hz, H-1''a, 1H), 3,96 (d, $J_{H3,H4}=3,12$ Hz, H-3, 1H), 3,55 (td, NH, $J_{NH,P} = J_{NH,H-3'a} = 10,1$ Hz, $J_{NH,H-3'b} = 5,62$ Hz, 1H), 3,47 (dt, $J_{H-1''a,H2''}=J_{H-1''b,H2''}=6,93$ Hz, H-1''b, 1H), 1,64-1,56 (m, H-2'', 2H), 1,41 (s, CH₃, i-Prop, 3H), 1,33-1,27 (m, CH₃-i-Prop, 2CH₃-Et, H-3'',H-4'', H-5'', H-6'', H-7'', H-8'', H-9'', H-10'', H-11'', 27H), 0,88 (t, $J_{H-12'',H-11''a}=J_{H-12'',H-11''b}=6,98$ Hz, 3H)ppm. **¹³C NMR** (100 MHz, , CDCl₃): $\delta = 136,32$ (C-2'), 133,33 (C-1'), 112,15 (Cq, i-Prop), 105,09 (C-1), 82,80 (C-3), 81,96 (C-2), 79,92 (C-4), 70,60 (C-1''), 62,70-63,59 (m, 2CH₂, Et), 47,75 (C-5), 34,08 (C-3'), 31,91; 29,63; 29,58; 29,41; 29,35; 26,05; 22,69 (C-3'',4'',5'',6'',7'',8'',9'',10'',11''), 26,66; 26,17 (2CH₃, i-prop), 16,22-16,10 (m, 2CH₃, Et), 14,13 (C-12'')ppm. **³¹P-RMN** (142 MHz, CDCl₃): $\delta = 7,82$ ppm. **HRMS**: calcd. para C₂₇H₅₁N₄O₇P [M + H]⁺ 575.3568; experimental 575.3570; calcd. para C₂₇H₅₁N₄O₇P [M + Na]⁺ 597.3388; experimental 597.3388.



4.1.20. Procedimento geral para a desproteção do grupo isopropilideno 1,2 e acetilação.

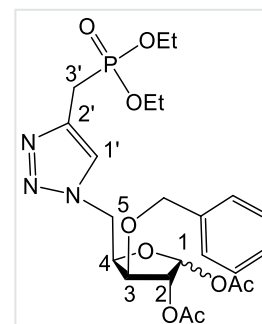
O composto foi dissolvido numa solução de TFA 65% aquoso (3mL para 0,1g de composto) e a mistura reacional foi deixada à temperatura ambiente durante 2h. O término da reação foi verificado por TLC e a água foi evaporada com ajuda de tolueno. Após se obter o composto seco, foram adicionados 2mL de piridina e 1,5mL de anidrido acético. Após o término da reação (90min), o resíduo foi co-evaporado com tolueno e o crude foi purificado através de uma coluna de cromatografia.

4.1.20.1. Síntese dos compostos 59 e 60

Os compostos **59** e **60** foram sintetizados de acordo com o procedimento descrito em 1.19, partindo dos compostos **49** (0,05g; 0,099mmol) e **50** (0,109g; 0,19mmol). Em ambos os casos, foi feita uma coluna de cromatografia utilizando 6:1 AcOEt/Hex como eluente, tendo sido obtidas mistura de anômeros α/β , em proporções de 1: 0,5, com um rendimento de 53% e 68% (óleos incolores).

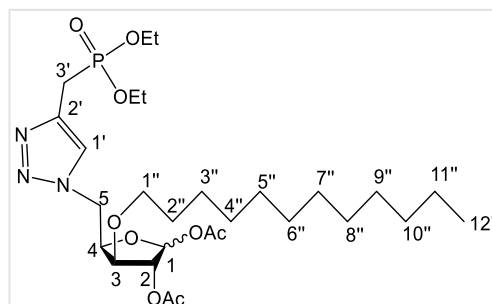
1,2-Di-*O*-acetil-3-*O*-benzil-5-desoxi-5-[4-(dietilfosfono)metil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il]- α,β -D-xilofuranose ou Dietil {[1-(1,2-di-*O*-acetil-3-*O*-benzil-5-desoxi- α,β -D-xilofuranos-5-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metil}fosfonato (59**)**

$R_f = 0,52$ (AcOEt); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,65$ (s, H-1' α , H-1' β , 1,5H), 7,45-7,33 (m, Ph, α , β , 7,5H), 6,47 (d, $J_{H1',H2'}=4,46$ Hz, H-1' α , 1H), 6,17 (s, H-1' β , 0,5H), 5,33-5,31 (m, H-2' α , H-2' β , 1,5H), 4,85 (d, Parte A do sistema AB, $J_{Ha,Hb}=11,79$ Hz, H-a, CH₂, Bn, β , 0,5H), 4,76-4,67 (m, H-a, CH₂, Bn, α , H-5a α , H-5a β , H-3 α , H-3 β , 4H), 4,62-4,55 (m, H-b, CH₂, Bn, α , H-b, CH₂, Bn, β , $J_{Ha,Hb}=11,79$ Hz, H-5b β , 2H), 4,48 (dd, Parte B do sistema ABX, $J_{H5a,H5b}=13,62$, $J_{H4,H5b}=7,65$ Hz, H-5b α , 1H), 4,28-4,26 (m, H-4 α , 1H), 4,15-4,06 (m, 2CH₂, Et, H-4 β , 6,5H), 3,34-3,29 (m, H-3', α , β , 3H), 2,15 (s, CH₃, OAc, β , 1,5H), 2,12 (s, CH₃, OAc, β , 1,5H), 2,10 (s, CH₃, OAc, α , 3H), 2,05 (s, CH₃, OAc, α , 3H), 1,30 (t, $J_{CH_3,CH_2}=7,05$ Hz, 2CH₃, Et, 9H). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 169,53$, 169,13 (C=O, OAc), 138,50, 138,43 (C-2', α , β), 128,68-127,95 (Ph), 124,02 (C-1', β), 123,98 (C-1', α), 99,65 (C-1, β), 94,05 (C-1, α), 81,60 (C-3, β), 79,88 (C-4), 78,95 (C-2, β), 78,05 (C-3, α), 76,39 (C-2, α), 72,34 (CH₂-Bn, α), 72,02 (CH₂-Bn, β), 62,40, 62,33 (CH₂, Et, α , β), 49,97 (C-5, α , β), 24,14 ($J_{C,P}=142,86$ Hz, C-3', α , β), 21,18, 20,94, 20,79, 20,50 (CH₃, OAc, α , β), 16,40, 16,34 (CH₃, Et, α , β). $^{31}\text{P-RMN}$ (142 MHz, CDCl_3): $\delta = 24,79$ ppm. **HRMS**: calcd. para C₂₃H₃₂N₃O₉P [M + H]⁺ 526.1949; experimental 526.1959; calcd. para C₂₃H₃₂N₃O₉P [M + Na]⁺ 548.1768; experimental 548.1774.



1,2-Di-*O*-acetil-5-desoxi-5-[4-(dietilfosfono)metil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il]-3-*O*-dodecil- α,β -D-xilofuranose ou Dietil {[1-(1,2-di-*O*-acetil-5-desoxi-3-*O*-dodecil- α,β -D-xilofuranos-5-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metil}fosfonato (60**)**

$R_f = 0,61$ (16:1, AcOEt/MeOH); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,68$ (d, $J_{H1',H3'}=1,59$ Hz, H-1' α , H-1' β , 1,5H), 6,41 (d, $J_{H1',H2'}=4,43$ Hz, H-1' α , 1H), 6,11 (s, H-1' β , 0,5H), 5,23-5,18 (m, H-2' α , H-2' β , 1,5H), 4,77-4,62 (m, H-4 α , H-4 β , 1,5H), 4,15-4,01 (m, H-5a, H-3, 2CH₂-Et, α , β , 9H), 3,97-3,91 (m, H-5b, α , β , 1,5H), 3,62 (dt, $J_{H1''a,H1''b}=12,77$ Hz, $J_{H1''a,H2''a}=J_{H1''a,H2''b}=6,26$ Hz, H-1''a, α , β ,



1,5H), 3,50-3,40 (m, H-1''b, α , β , 1,5H), 3,35-3,26 (m, H-3', α , β , 3H), 2,12 (s, CH₃, OAc, β , 1,5H), 2,08 (s, CH₃, OAc, α , 3H), 2,07 (s, CH₃, OAc, β , 1,5H), 2,03 (s, CH₃, OAc, α , 3H), 1,64-1,53 (m, H-2'', α , β , 3H), 1,38-1,19 (m, H-3'', H-4'', H-5'', H-6'', H-7'', H-8'', H-9'', H-10'', H-11'', 2CH₃-Et, α , β , 36H), 0,87 (t, $J_{H-12'',H-11''}=6,73$ Hz, H-12'' α , β , 4,5H) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 169,55, 169,14 (C=O, OAc), 138,40, 138,35 (C-2', α , β), 124,29, 123,73 (C-1', α , β), 99,57 (C-1, β), 93,94 (C-1, α), 80,79, 80,57 (C-3, α , β), 78,81 (C-2, β), 78,07 (C-4), 76,31 (C-2, α), 70,84, 70,68 (C-1'', α , β), 62,70-62,27 (CH₂, Et), 49,97 (C-5), 31,89, 29,77-29,29, 26,20-25,96, 22,67 (C-2'', C-3'', C-4'', C-5'', C-6'', C-7'', C-8'', C-9'', C-10'', C-11''), 24,80, 23,38; ($J_{C,P}=142,70$ Hz, C-3'), 21,16, 20,82, 20,76, 20,48 (CH₃, OAc, α , β), 16,37, 16,31 (d, $J_{C,P}=5,98$, CH₃, Et), 14,12 (C-12''). ³¹P-RMN (142 MHz, CDCl₃): δ = 24,69 ppm. **HRMS**: calcd. para C₂₈H₅₀N₃O₉P [M + H]⁺ 604.3357; experimental 604.3362; calcd. para C₂₈H₅₀N₃O₉P [M + Na]⁺ 626.3177; experimental 626.3179.

4.1.21. Procedimento geral para a N-glicosilação

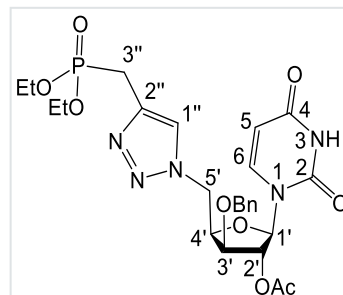
A uma mistura de uracilo (1,5 equivalentes em relação ao dador de glicosilo) em CH₃CN anidro ($c \sim 0,2$ M), foi adicionado BSA (3 equivalentes em relação ao dador de glicosilo). A mistura reacional ficou sob agitação e atmosfera inerte até dissolução completa. O dador de glicosilo 1-*O*-acetilado foi dissolvido em CH₃CN anidro ($c \sim 0,2$ M) e a mistura foi adicionado à solução contendo uracilo sililado. À mistura resultante foram adicionados lentamente 6 equivalentes de TMSOTf. A solução foi submetida a agitação e aquecimento sob radiação micro-ondas (150W, 250 Psi, 65°C) durante 30min. O término da reação foi verificado por TLC. O meio reacional foi diluído com AcOEt e foi neutralizado com uma solução NaHCO₃. As fases foram separadas e a fase aquosa foi extraída com AcOEt (2x). As fases orgânicas combinadas foram lavadas com solução saturada de NaCl e depois secadas com sulfato de magnésio anidro. Após filtração e concentração no evaporador rotativo, o resíduo foi sujeito a purificação por coluna de cromatografia.

4.1.21.1. Síntese dos compostos 61 e 62

Os compostos **61** e **62** foram sintetizados de acordo com o procedimento descrito em 4.1.21., partindo respetivamente dos compostos **59** (0,05g; 0,09mmol) e **60** (0,045g; 0,0799mmol). O eluente para a coluna de cromatografia, no primeiro caso, foi 18:1 AcOEt/MeOH e no segundo caso 24:1 AcOEt/MeOH. Os compostos foram obtidos com rendimentos de 53% (**61**) e 15% (**62**), sob a forma de óleos incolores.

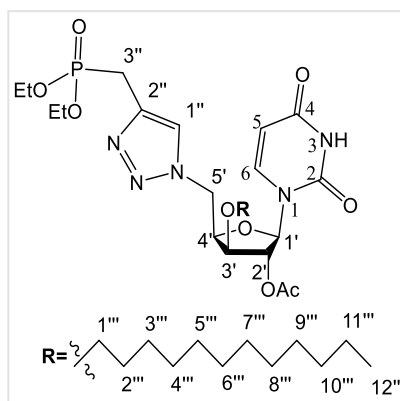
Dietil {[1-(2-*O*-acetil-3-*O*-benzil-1,5-didesoxi-1-uracil- α -D-xilofuranos-5-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metil}fosfonate ou 1-{2-*O*-acetil-3-*O*-benzil-1,5-didesoxi-5-[4-(dietoxifosfono)metil-1H-1,2,3-triazol-1-il]- α -D-xilofuranos-1-il}uracil (61)

$R_f = 0,71$ (8:0,5, AcOEt/MeOH); $[\alpha]_D^{20} = 6$ ($c=1$; CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 9,23$ (s, NH, 1H), 7,68 (s, H-1'', 1-H), 7,62 (d, $J_{H_6,H_5}=8,21$ Hz, H-6, 1H), 7,41-7,33 (m, Ph, 5H), 6,14 (s, H-1', 1H), 5,70 (d, $J_{H_5,H_6}=7,97$ Hz, H-5, 1H), 5,20 (s, H-2', 1H), 4,80 (d, Parte A do sistema AB, $J_{H_a,H_b}=11,25$ Hz, CH₂, Bn, 1H), 4,75-4,68 (m, H-5', 2H), 4,64 (d, Parte B do sistema AB, $J_{H_b,H_a}=11,25$ Hz, CH₂, Bn, 1H), 4,54-4,50 (m, H-4', 1H), 4,15-4,06 (m, 2CH₂, 2Et, 4H), 3,98 (d, $J_{H_3',H_4'}=3,28$ Hz, H-3' 1H), 3,32 (dd, $J_{H_3'a,H_3'b}=20,25$ Hz, $J_{H,P}=16,11$ Hz, H-3'', 2H), 2,15 (s, CH₃, Ac, 3H), 1,32-1,28 (m, 2CH₃, 2Et, 6H)ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 172,87$ (C=O, Ac, 3H), 169,66 (C=O, 4), 162,85 (C=O, 4), 150,01 (C=O, 2), 140 (C-6), 138,66 (d, $J_{C-2'',P}=6,74$ Hz, C-2'') 128,89; 128,82; 128,61 (Ph), 123,79 (C-1''), 103,06 (C-5), 88,79 (C-1'), 80,66 (C-4'), 79,68 (C-3'), 79,48 (C-2'), 72,02 (CH₂, Bn), 62,53-62,43 (m, 2CH₂, Et), 48,75 (C-5'), 24,73; 23,31 ($J_{C,P}=142,73$ Hz, C-3''), 20,79 (CH₃, Ac), 16,40; 16,34 (2CH₃, 2Et)ppm. ³¹P-RMN (142 MHz, CDCl₃): $\delta = 24,77$ ppm. **HRMS**: calcd. para C₂₅H₃₂N₅O₉P [M + H]⁺ 578.2010; experimental 578.2011; calcd. para C₂₅H₃₂N₅O₉P [M + Na]⁺ 600.1830; experimental 600.1830.



Dietil {[1-(2-*O*-acetil-1,5-didesoxi-3-*O*-dodecil-1-uracil- α -D-xilofuranos-5-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metil}fosfonate ou 1-{2-*O*-acetil-1,5-didesoxi-5-[4-(dietoxifosfono)metil-1H-1,2,3-triazol-1-il]-3-*O*-dodecil- α -D-xilofuranos-1-il}uracil (62)

$R_f = 0,15$ (AcOEt); $[\alpha]_D^{20} = 5$ ($c=1$; CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 8,71$ (s, NH, 1H), 7,73 (s, H-1'', 1-H), 7,67 (d, $J_{H_6,H_5}=8,21$ Hz, H-6, 1H), 6,12 (s, H-1', 1H), 5,80 (d, $J_{H_5,H_6}=7,97$ Hz, H-5, 1H), 5,11 (s, H-2', 1H), 4,83 (dd, Parte A do sistema ABX, $J_{H_5'a,H_5'b}=14,31$ Hz, $J_{H_5'a,H_4'}=4,73$ Hz, H-5'a, 1H), 4,69-4,64 (m, Parte B do sistema ABX, H-5'b, 2H), 4,56-4,53 (m, H-4', 1H), 4,16-4,07 (sext, 2CH₂, 2Et, 4H), 3,86 (d, $J_{H_3',H_4'}=3,37$ Hz, H-3' 1H),), 3,76 (dt, $J_{H-1''a,H-1''b}=15,89$ Hz, H-1''a, 1H), 3,54 (dt, $J_{H-1''b,H_2''}=J_{H-1''a,H_2''}=6,42$ Hz, H-1''a, 1H), 3,35 (dd, $J_{H_3'a,H_3'b}=20,50$ Hz, $J_{H,P}=15,92$ Hz, H-3'', 2H), 2,15 (s, CH₃, Ac, 3H), 1,59 (m, C-2''', 2H), 1,33-1,28 (m, 2CH₃-i-Prop, 2CH₃-Et, H-3'',H-4'', H-5'', H-6'', H-7'', H-8'', H-9'', H-10'', H-11'', 30H), 0,90 (t, $J_{H-12'',H-11''a}=J_{H-12'',H-11''b}=6,91$ Hz, 3H) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 172,62$ (C=O, Ac), 169,49 (C=O, 4), 162,54 (C=O, 4), 149,85 (C=O, 2), 140,03 (C-6), 138,7 (C-2''),



123,68 (C-1''), 102,99 (C-5), 88,84 (C-1'), 80,86 (C-4'), 80,78 (C-3'), 79,32 (C-2'), 62,51-62,41 (m, 2CH₂, Et), 48,65 (C-5'), 31,92; 29,71-29,36; 26,23; 24,75; 22,70; 22,66 (2CH₃-i-Prop, C-2'',3'',4'',5'',6'',7'',8'',9'',10'',11''), 24,75; 23,33 (J_{C,P}=142,86 Hz, C-3''), 20,76 (CH₃, Ac), 16,40; 16,34 (2CH₃, 2Et), 14,15 (C-12''')ppm. ³¹P-RMN (142 MHz, CDCl₃): δ = 24,72ppm. **HRMS**: calcd. para C₃₀H₅₀N₅O₉P [M + H]⁺ 656.3419; experimental 656.3434; calcd. para C₃₀H₅₀N₅O₉P [M + Na]⁺ 678.3238; experimental 678.3254.

4.2. Metodologia – *Docking* Molecular

Os estudos de *docking* molecular utilizaram o programa AutoDock Vina 1.1.2. Usaram-se como alvo três estruturas de uma cinase dependente de ciclina (CDK2), uma cristalizada com ATP (PDB: 4EOQ), outra com o inibidor 4-{[6-(ciclo-hexilmetoxi)-9H-purina-2-il]amino}benzenossulfonamida (4SP, PDB: 4EOR)⁶⁷ e outra com o inibidor (5E)-5-(quinolin-6-il-metilideno)-2-(tiofen-2-il-metilamino)-1,3-tiazol-4-ona (1RO, PDB:4EOS)^{67,68}.

Adicionalmente, também se definiu como alvo um estrutura de uma glicogénio sintase cinase 3beta (GSK3β) complexada com o inibidor 6-(2-{[4-(2,4-diclorofenil)-5-(4-metil-1H-imidazol-2-il)pirimidin-2-il]amino}etilamino)piridina-3- carbonitrilo (65C, PDB: 6B8J)²⁵.

O motivo pelo qual foram feitos estudos de *docking* considerando diferentes estruturas para a CDK2, deveu-se ao facto de os alvos nas simulações de *docking* molecular serem rígidos, ou seja, não há adaptação dos resíduos de aminoácidos da enzima ao composto. Desta forma, usando diferentes conformações para a enzima adaptadas a diferentes compostos, tentou minimizar-se este problema.

Os respetivos ficheiros PDB foram obtidos a partir da Protein Data Bank (www.rcsb.org), tendo sido eliminados todos os átomos que não correspondessem à enzima. Foram também criados ficheiros para os respetivos inibidores a partir do ficheiro PDB original, copiando apenas os átomos e coordenadas correspondentes a esses compostos.

Os modelos dos compostos em estudo (**Tabelas 2 e 3**) foram desenhados utilizando o programa Chemcraft e as suas estruturas foram posteriormente otimizadas, utilizando um método quântico (HF/6-31G*), gerando desta forma um ficheiro contendo as coordenadas de um mínimo dessa molécula.

Relativamente aos compostos da PubChem, foi feita uma pesquisa no respetivo site (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando o cerne da estrutura dos compostos desejados como critério de procura, escolheram-se os compostos que respeitavam a regra dos 5 de Lipinski

e foi feito o *download* do ficheiro contendo essa informação. Desse ficheiro foram retiradas as coordenadas (estrutura) de cada ligando e foi atribuído a cada ficheiro o respetivo CID do composto. Para garantir a relaxação do modelo tridimensional destes compostos, os mesmos foram otimizados usando o método semiempírico PM6.

Para preparar os ficheiros para o docking molecular, utilizou-se o programa Autodock Tools (ADT) e os respetivos ficheiros PDB. Aos alvos foram adicionados apenas os hidrogénios polares tendo sido gerados os ficheiros pdbqt necessários. O espaço de procura em cada alvo foi definido centrando uma caixa cúbica de dimensão de 30 Å nas coordenadas de raios-X do respetivo inibidor ou ATP.

Nas simulações de *docking* com o AutoDock Vina fizeram-se para cada ligando 15 corridas independentes obtendo 20 soluções em cada uma (ou seja, 300 poses para cada), tendo sido escolhido a pose com menor energia para cada composto (melhor resultado). Os melhores resultados foram ordenados e foi obtido um rank com os valores de afinidade para cada composto.

5. Bibliografia

- (1) Zhang, J.; Yang, P. L.; Gray, N. S. Targeting Cancer with Small Molecule Kinase Inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, 9 (1), 28–39.
- (2) Combs, A. P.; Yue, E. W.; Bower, M.; Ala, P. J.; Wayland, B.; Douty, B.; Takvorian, A.; Polam, P.; Wasserman, Z.; Zhu, W.; et al. Structure-Based Design and Discovery of Protein Tyrosine Phosphatase Inhibitors Incorporating Novel Isothiazolidinone Heterocyclic Phosphotyrosine Mimetics. *J. Med. Chem.* **2005**, 48 (21), 6544–6548.
- (3) Moen, M. D.; McKeage, K.; Plosker, G. L.; Siddiqui, M. A. A. Imatinib: A Review of Its Use in Chronic Myeloid Leukaemia . *Drugs* **2007**, 67 (2), 299–320.
- (4) Mariaule, G.; Belmont, P. Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors as Marketed Anticancer Drugs: Where Are We Now? A Short Survey. *Molecules* **2014**, 19 (9), 14366–14382.
- (5) Druker B.J.; Talpaz M.; Resta DJ.; Peng B.; Buchdunger E.; Ford J. M.; Lydon N. B.; Kantarjian H.; Capdeville R.; Ohno-Jones S.; S. C. Efficacy and Safety of a Specific Inhibitor of the Bcr-Abl Tyrosine. *English J.* **2001**, 344 (14), 1031–1037.
- (6) Gambacorti-Passerini, C. B.; Gunby, R. H.; Piazza, R.; Galiotta, A.; Rostagno, R.; Scapozza, L. Molecular Mechanisms of Resistance to Imatinib in Philadelphia-Chromosome-Positive Leukaemias. *Lancet Oncol.* **2003**, 4 (2), 75–85.
- (7) Knockaert, M.; Greengard, P.; Meijer, L. Pharmacological Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinases. *Trends Pharmacol. Sci.* **2002**, 23 (9), 417–425.
- (8) Murray, A. W. Recycling the Cell Cycle: Cyclins Revisited. *Cell* **2004**, 116 (2), 221–234.
- (9) CRNAero, A. Targeting the Cell Cycle for Cancer Therapy. *Br. J. Cancer* **2002**, 87 (2), 129–133.
- (10) Anassi, E.; Ndefo, U. A. Sipuleucel-T (Provenge) Injection: The First Immunotherapy Agent (Vaccine) for Hormone-Refractory Prostate Cancer. *P&T* **2011**, 36 (4), 197–202.
- (11) Housman, G.; Byler, S.; Heerboth, S.; Lapinska, K.; Longacre, M.; Snyder, N.; Sarkar, S. Drug Resistance in Cancer: An Overview. *Cancers (Basel).* **2014**, 6 (3), 1769–1792.
- (12) Echaliier, A.; Hole, A. J.; Lolli, G.; Endicott, J. A.; Noble, M. E. M. An Inhibitor's-Eye View of the Atp-Binding Site of CDKs in Different Regulatory States. *ACS Chem. Biol.* **2014**, 9 (6), 1251–1256.
- (13) Rose, A. S.; Hildebrand, P. W. NGL Viewer: A Web Application for Molecular

Visualization. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43* (W1), W576–W579.

- (14) Rose, A. S.; Bradley, A. R.; Valasatava, Y.; Duarte, J. M.; Prlić, A.; Rose, P. W. Web-Based Molecular Graphics for Large Complexes. *Proc. 21st Int. Conf. Web3D Technol. - Web3D '16* **2016**, No. 1, 185–186.
- (15) Lapenna, S.; Giordano, A. Cell Cycle Kinases as Therapeutic Targets for Cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8* (7), 547–566.
- (16) Cai, D.; Byth, K. F.; Shapiro, G. I. AZ703, an Imidazo[1,2-a]Pyridine Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinases 1 and 2, Induces E2F-1-Dependent Apoptosis Enhanced by Depletion of Cyclin-Dependent Kinase 9. *Cancer Res.* **2006**, *66* (1), 435–444.
- (17) Kelland, L. R. Flavopiridol, the first cyclin-dependent kinase inhibitor to enter the clinic: current status. *Exp. Opin. Invest. Drugs* **2000**, *9* (12), 2903–2911.
- (18) Khalil, H. S.; Mitev, V.; Vlaykova, T.; Cavicchi, L.; Zhelev, N. Discovery and Development of Seliciclib. How Systems Biology Approaches Can Lead to Better Drug Performance. *J. Biotechnol.* **2015**, *202*, 40–49.
- (19) Kumar, S. K.; Laplant, B.; Chng, W. J.; Zonder, J.; Callander, N.; Fonseca, R.; Fruth, B.; Roy, V.; Erlichman, C.; Stewart, A. K.; et al. Dinaciclib, a Novel CDK Inhibitor, Demonstrates Encouraging Single-Agent Activity in Patients with Relapsed Multiple Myeloma. *Blood* **2016**, *125* (3), 443–449.
- (20) Cho, S. J.; Lee, S. S.; Kim, Y. J.; Park, B. D.; Choi, J. S.; Liu, L. H.; Ham, Y. M.; Moon Kim, B.; Lee, S. K. Xylocydine, a Novel Cdk Inhibitor, Is an Effective Inducer of Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Cells in Vitro and in Vivo. *Cancer Lett.* **2010**, *287* (2), 196–206.
- (21) Sun, C.; Guo, X.; Zhu, D.; Xiao, C.; Bai, X.; Li, Y.; Zhan, Z. Apoptosis Is Induced in Cancer Cells via the Mitochondrial Pathway by the Novel Xylocydine-Derived Compound JRS-15. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14* (1), 850–870.
- (22) Nemunaitis, J. J.; Small, K. A.; Kirschmeier, P.; Zhang, D.; Zhu, Y.; Jou, Y.; Statkevich, P.; Yao, S.; Bannerji, R. A First-in-Human, Phase 1, Dose-Escalation Study of Dinaciclib, a Novel Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor, Administered Weekly in Subjects with Advanced Malignancies. *J. Transl. Med.* **2013**, *11*, 259.
- (23) Meijer, L.; Flajolet, M.; Greengard, P. Pharmacological Inhibitors of Glycogen Synthase Kinase 3. *Trends Pharmacol. Sci.* **2004**, *25* (9), 471–480.
- (24) Dajani, R.; Fraser, E.; Roe, S. M.; Young, N.; Good, V.; Dale, T. C.; Pearl, L. H. Crystal

Structure of Glycogen Synthase Kinase 3 Beta: Structural Basis for Phosphate-Primed Substrate Specificity and Autoinhibition. *Cell* **2001**, *105* (6), 721–732.

- (25) Wagman, A. S.; Boyce, R. S.; Brown, S. P.; Fang, E.; Goff, D.; Jansen, J. M.; Le, V. P.; Levine, B. H.; Ng, S. C.; Ni, Z. J.; et al. Synthesis, Binding Mode, and Antihyperglycemic Activity of Potent and Selective (5-Imidazol-2-yl-4-Phenylpyrimidin-2-yl)[2-(2-Pyridylamino)Ethyl]Amine Inhibitors of Glycogen Synthase Kinase 3. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (20), 8482–8514.
- (26) Joep, R. S. Lithium and GSK-3: One Inhibitor, Two Inhibitory Actions, Multiple Outcomes. *Trends Pharmacol. Sci.* **2003**, *24* (9), 441–443.
- (27) Strooper, B. De; Woodgett, J. Mental Plaque Removal. *Nature* **2003**, *423* (6938), 392–393.
- (28) Ryder, J.; Su, Y.; Ni, B. Akt/GSK3 β Serine/Threonine Kinases: Evidence for a Signalling Pathway Mediated by Familial Alzheimer's Disease Mutations. *Cell. Signal.* **2004**, *16* (2), 187–200.
- (29) Phiel, C. J.; Wilson, C. a; Lee, V. M.; Klein, P. S. GSK-3 α Regulates Production of Alzheimer ' s Disease Amyloid- β Peptides. *Nature* **2003**, *17* (6938), 435–440.
- (30) Welsh, G. I.; Proud, C. G. Glycogen Synthase Kinase-3 Is Rapidly Inactivated in Response to Insulin and Phosphorylates Eukaryotic Initiation Factor EIF-2B. *Biochem. J.* **1993**, *294* (Pt 3), 625–629.
- (31) Bock, A. S.; Leigh, N. D.; Bryda, E. C. Effect of Gsk3 Inhibitor CHIR99021 on Aneuploidy Levels in Rat Embryonic Stem Cells. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.* **2014**, *50* (6), 572–579.
- (32) Sklirou, A. D.; Gaboriaud-Kolar, N.; Papassideri, I.; Skaltsounis, A. L.; Trougakos, I. P. 6-Bromo-Indirubin-3'-Oxime (6BIO), a Glycogen Synthase Kinase-3 β Inhibitor, Activates Cytoprotective Cellular Modules and Suppresses Cellular Senescence-Mediated Biomolecular Damage in Human Fibroblasts. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 1–13.
- (33) Ye, S.; Tan, L.; Yang, R.; Fang, B.; Qu, S.; Schulze, E. N.; Song, H.; Ying, Q.; Li, P. Pleiotropy of Glycogen Synthase Kinase-3 Inhibition by CHIR99021 Promotes Self-Renewal of Embryonic Stem Cells from Refractory Mouse Strains. *PLoS One* **2012**, *7* (4).
- (34) Diaz-Velasquez, C. E.; Castro-Muñozledo, F.; Kuri-Harcuch, W. Staurosporine Rapidly Commits 3T3-F442A Cells to the Formation of Adipocytes by Activation of GSK-3 β and Mobilization of Calcium. *J. Cell. Biochem.* **2008**, *105* (1), 147–157.

- (35) Löwenberg, B.; Pabst, T.; Vellenga, E.; van Putten, W.; Schouten, H. C.; Graux, C.; Ferrant, A.; Sonneveld, P.; Biemond, B. J.; Gratwohl, A.; et al. Cytarabine Dose for Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *364* (11), 1027–1036.
- (36) Pereira, S.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. Mechanism for Ribonucleotide Reductase Inactivation by the Anticancer Drug Gemcitabine. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25* (10), 1286–1294.
- (37) Tam, C. S.; O'Brien, S.; Wierda, W.; Kantarjian, H.; Wen, S.; Do, K.; Thomas, D. A.; Cortes, J.; Lerner, S.; Keating, M. J.; et al. Long-Term Results of the Fludarabine , Cyclophosphamide , and Rituximab Regimen as Initial Therapy of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* **2015**, *112* (4), 975–981.
- (38) Gane, E. J.; Stedman, C. A.; Hyland, R. H.; Ding, X.; Svarovskaia, E.; Symonds, W. T.; Hindes, R. G.; Berrey, M. M. Nucleotide Polymerase Inhibitor Sofosbuvir plus Ribavirin for Hepatitis C. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *368* (1), 34–44.
- (39) Shelton, J.; Lu, X.; Hollenbaugh, J. A.; Cho, J. H.; Amblard, F.; Schinazi, R. F. Metabolism, Biochemical Actions, and Chemical Synthesis of Anticancer Nucleosides, Nucleotides, and Base Analogs. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (23), 14379–14455.
- (40) Serpi, M.; Ferrari, V.; Pertusati, F. Nucleoside Derived Antibiotics to Fight Microbial Drug Resistance: New Utilities for an Established Class of Drugs? *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (23), 10343–10382.
- (41) Winn, M.; Goss, R. J. M.; Kimura, K. I.; Bugg, T. D. H. Antimicrobial Nucleoside Antibiotics Targeting Cell Wall Assembly: Recent Advances in Structure-Function Studies and Nucleoside Biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27* (2), 279–304.
- (42) Marcelo, F.; Huecas, S.; Ruiz-a, L. B.; Can, F. J.; Perona, A.; Poveda, A.; Mart, S.; Morreale, A.; Andreu, J. M. Interactions of Bacterial Cell Division Protein FtsZ with C8 Substituted Guanine Nucleotide Inhibitors. A Combined NMR, Biochemical and Molecular Modeling Perspective. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (44), 16418–16428.
- (43) Chaudhary, P. M.; Chavan, S. R.; Shirazi, F.; Razdan, M.; Nimkar, P.; Maybhate, S. P.; Likhite, A. P.; Gonnade, R.; Hazara, B. G.; Deshpande, M. V.; et al. Exploration of Click Reaction for the Synthesis of Modified Nucleosides as Chitin Synthase Inhibitors. *Bioorganic Med. Chem.* **2009**, *17* (6), 2433–2440.
- (44) Xavier, N. M.; Schwarz, S.; Vaz, P. D.; Csuk, R.; Rauter, A. P. Synthesis of Purine Nucleosides from D -Glucuronic Acid Derivatives and Evaluation of Their Cholinesterase-Inhibitory Activities. *Eur. J. Org. Chem* **2014**, *45* (12), 2770–2779.

- (45) Marcelo, F.; Silva, F. V. M.; Goulart, M.; Justino, J.; Sinaý, P.; Blériot, Y.; Rauter, A. P. Synthesis of Novel Purine Nucleosides towards a Selective Inhibition of Human Butyrylcholinesterase. *Bioorganic Med. Chem.* **2009**, *17* (14), 5106–5116.
- (46) Pastor-Anglada, M.; Pérez-Torras, S. Nucleoside Transporter Proteins as Biomarkers of Drug Responsiveness and Drug Targets. *Front. Pharmacol.* **2015**, *6*, 1–14.
- (47) Yue, L.; Saikawa, Y.; Ota, K.; Tanaka, M.; Nishimura, R.; Uehara, T.; Maeba, H.; Ito, T.; Sasaki, T.; Koizumi, S. A Functional Single-Nucleotide Polymorphism in the Human Cytidine Deaminase Gene Contributing to Ara-C Sensitivity. *Pharmacogenetics* **2003**, *13* (1), 29–38.
- (48) Thornton, P. J.; Kadri, H.; Miccoli, A.; Mehellou, Y. Nucleoside Phosphate and Phosphonate Prodrug Clinical Candidates. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (23), 10400–10410.
- (49) Andrei, G.; Topalis, D.; De Schutter, T.; Snoeck, R. Insights into the Mechanism of Action of Cidofovir and Other Acyclic Nucleoside Phosphonates against Polyoma- And Papillomaviruses and Non-Viral Induced Neoplasia. *Antiviral Res.* **2015**, *114*, 21–46.
- (50) Fung, S. K.; Chae, H. B.; Fontana, R. J.; Conjeevaram, H.; Marrero, J.; Oberhelman, K.; Hussain, M.; Lok, A. S. F. Virologic Response and Resistance to Adefovir in Patients with Chronic Hepatitis B. *J. Hepatol.* **2006**, *44* (2), 283–290.
- (51) Marcellin, P.; Heathcote, E. J.; Buti, M.; Gane, E.; de Man, R. A.; Krastev, Z.; Germanidis, G.; Lee, S. S.; Flisiak, R.; Kaita, K.; et al. Tenofovir Disoproxil Fumarate versus Adefovir Dipivoxil for Chronic Hepatitis B. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *359* (23), 2442–2455.
- (52) Florescu, D. F.; Keck, M. A. Development of CMX001 (Brincidofovir) for the Treatment of Serious Diseases or Conditions Caused by DsDNA Viruses. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2014**, *12* (10), 1171–1178.
- (53) Tobias, S. C.; Borch, R. F. Synthesis and Biological Evaluation of a Cytarabine Phosphoramidate Prodrug. *Mol. Pharm.* **2004**, *1* (2), 112–116.
- (54) Xavier, N. M.; Gonçalves-pereira, R.; Jorda, R.; Řezníčková, E. Synthesis and Antiproliferative Evaluation of Novel Azido Nucleosides and Their Phosphoramidate Derivatives. *Pure Appl. Chem.* **2017**, *89* (9) 1–16.
- (55) Batista, D.; Schwarz, S.; Loesche, A.; Csuk, R.; Costa, P. J.; Oliveira, M. C.; Xavier, N. M. Synthesis of Glucopyranos-6'-yl Purine and Pyrimidine Isonucleosides as Potential Cholinesterase Inhibitors. Access to Pyrimidine-Linked Pseudodisaccharides through Mitsunobu Reaction. *Pure Appl. Chem* **2016**, *88* (4), 363–379.

- (56) Pradere, U.; GRNAier-Amblard, E. C.; Coats, S. J.; Amblard, F.; Schinazi, R. F. Synthesis of Nucleoside Phosphate and Phosphonate Prodrugs. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (18), 9154–9218.
- (57) Wolfe, J. L.; Kawate, T. Synthesis and Polymerase Incorporation of 5'-Amino-2',5'-Dideoxy-5'-N-Triphosphate Nucleotides. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30* (17), 3739–3747.
- (58) Fabbro, D.; Ruetz, S.; Buchdunger, E.; Cowan-Jacob, S. W.; Fendrich, G.; Liebetanz, J.; Mestan, J.; O'Reilly, T.; Traxler, P.; Chaudhuri, B.; et al. Protein Kinases as Targets for Anticancer Agents: From Inhibitors to Useful Drugs. *Pharmacol. Ther.* **2002**, *93* (2–3), 79–98.
- (59) Xavier, N. M.; Lucas, S. D.; Jorda, R.; Schwarz, S.; Loesche, A.; Csuk, R.; Oliveira, M. C. Synthesis and Evaluation of the Biological Profile of Novel Analogues of Nucleosides and of Potential Mimetics of Sugar Phosphates and Nucleotides. *Synlett* **2015**, *26* (19), 2663–2672.
- (60) Wilkinson, B. L.; Long, H.; Sim, E.; Fairbanks, A. J. Synthesis of Arabino Glycosyl Triazoles as Potential Inhibitors of Mycobacterial Cell Wall Biosynthesis. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (23), 6265–6267.
- (61) Santana, G.; Francisco, C. G.; Su, E.; Gonz, C.; Astrofi, A.; Tenerife, L. L. Synthesis of Guanidines From Azides: A General And Straightforward Methodology In Carbohydrate Chemistry. *J. Org. Chem* **2010**, *75* (15), 5371–5374.
- (62) Evans A .R. The Rise of Azide – Alkyne 1,3-Dipolar 'Click' Cycloaddition and Its Application to Polymer Science and Surface Modification. *Aust. J. Chem.* **2007**, *60* (6), 384–395.
- (63) Kitchen, D. B.; Decornez, H.; Furr, J. R.; Bajorath, J. Docking and Scoring in Virtual Screening for Drug Discovery: Methods and Applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3* (11), 935–949.
- (64) Brooks, B. R.; III, C. L. B.; A. D. Mackerell, J.; Nilsson, L.; Petrella, R. J.; Roux, B.; Won, Y.; Archontis, G.; Bartels, C.; Boresch, S.; et al. Software News and Update AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30* (10), 1545–1614.
- (65) Creary, X.; Anderson, A.; Brophy, C.; Crowell, F.; Funk, Z. Method for Assigning Structure of 1,2,3-Triazoles. *J. Org. Chem.* **2012**, *77* (19), 8756–8761.
- (66) Thompson, A. S.; Humphrey, G. R.; DeMarco, A. M.; Mathre, D. J.; Grabowski, E. J. J. Direct Conversion of Activated Alcohols to Azides Using Diphenyl Phosphorazidate. A

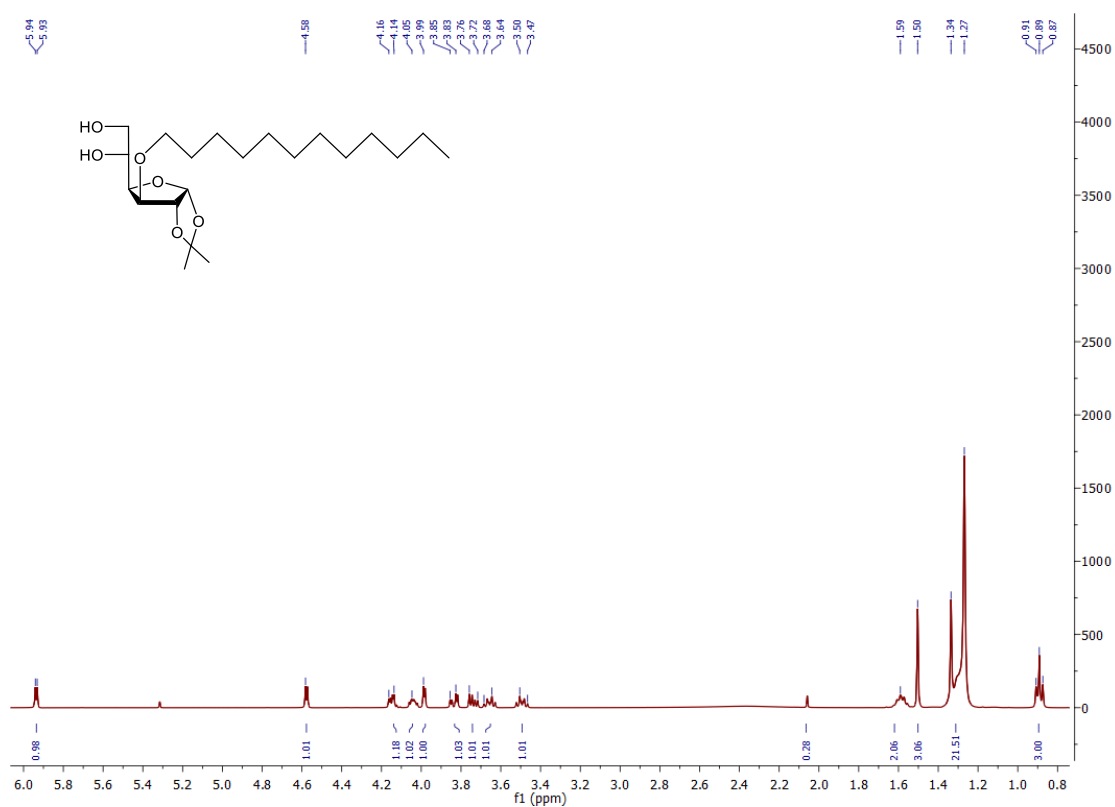
- Practical Alternative to Mitsunobu Conditions. *J. Org. Chem.* **1993**, 58 (22), 5886–5888.
- (67) Echalier, A.; Cot, E.; Camasses, A.; Hodimont, E.; Hoh, F.; Jay, P.; Sheinerman, F.; Krasinska, L.; Fisher, D. An Integrated Chemical Biology Approach Provides Insight into Cdk2 Functional Redundancy and Inhibitor Sensitivity. *Chem. Biol.* **2012**, 19 (8), 1028–1040.
- (68) Coxon, C. R.; Anscombe, E.; HRNAor, S. J.; Martin, M. P.; Carbain, B.; Golding, B. T.; Hardcastle, I. R.; Harlow, L. K.; Korolchuk, S.; Matheson, C. J.; et al. Cyclin-Dependent Kinase (CDK) Inhibitors: Structure – Activity Relationships and Insights into the CDK - 2 Selectivity of 6 - Substituted 2 - Arylaminopurines. *J. Med. Chem* **2017**, 60 (5), 1746–1767.

Anexo A

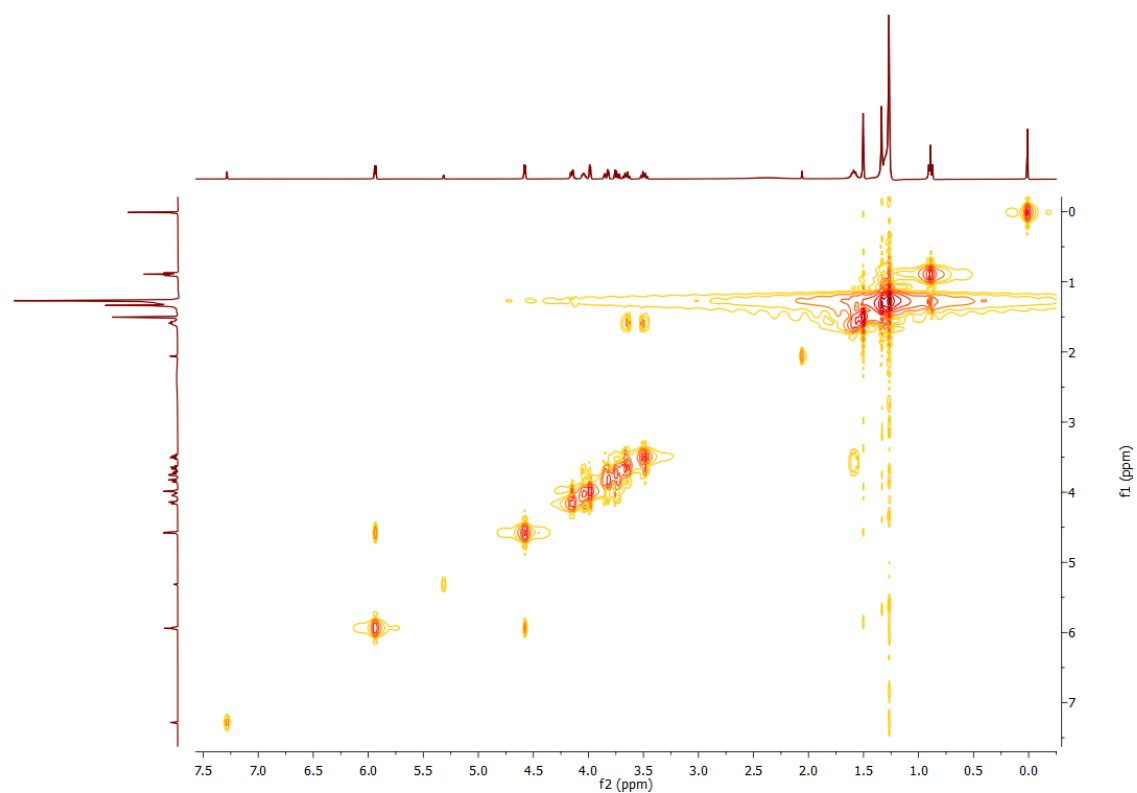
A1 – Espetros de RMN dos compostos sintetizados

A1.1. Espetros de RMN do composto 5

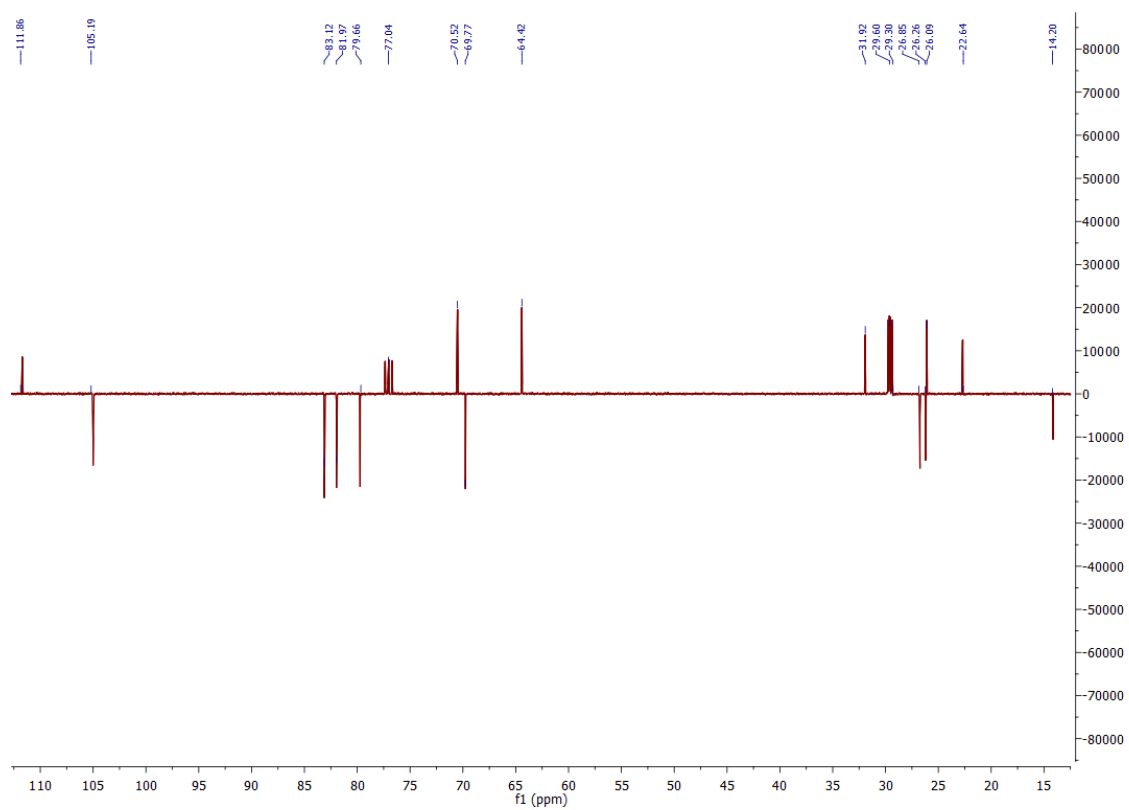
Anexo A 1.1.1. Espetro de ^1H -RMN



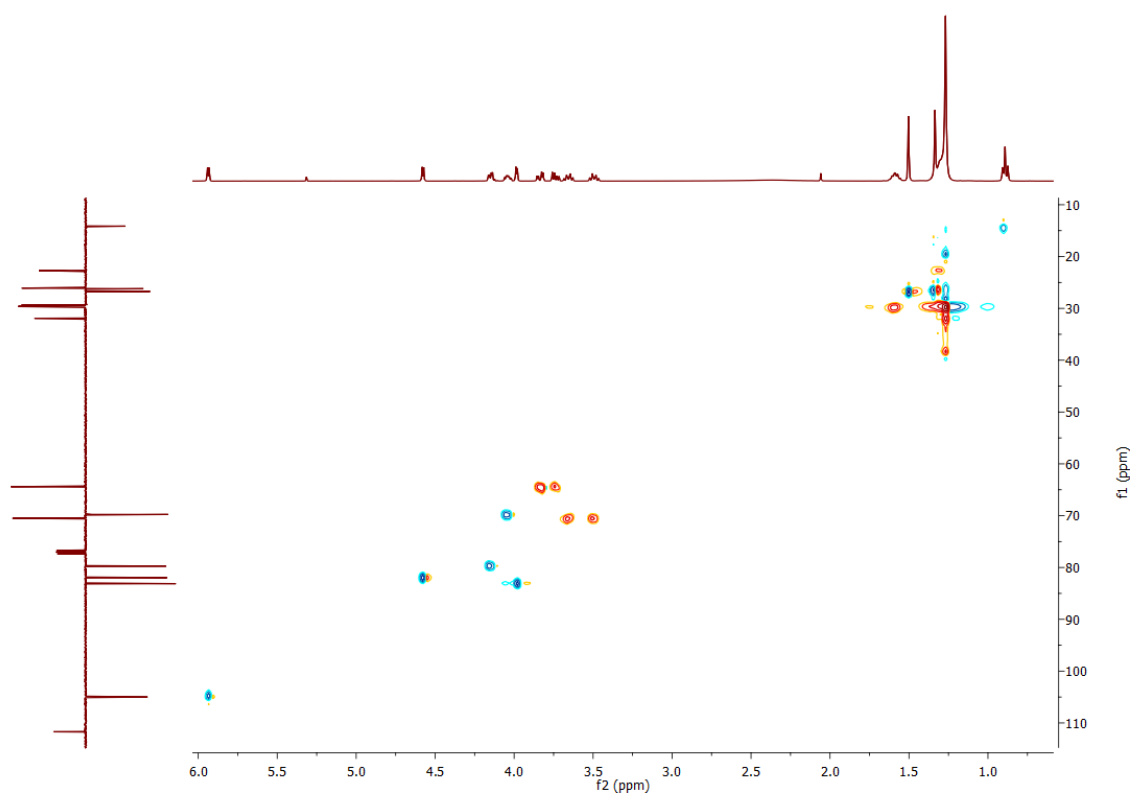
Anexo A 1.1.2. Espectro de COSY



Anexo A 1.1.3. Espectro de APT

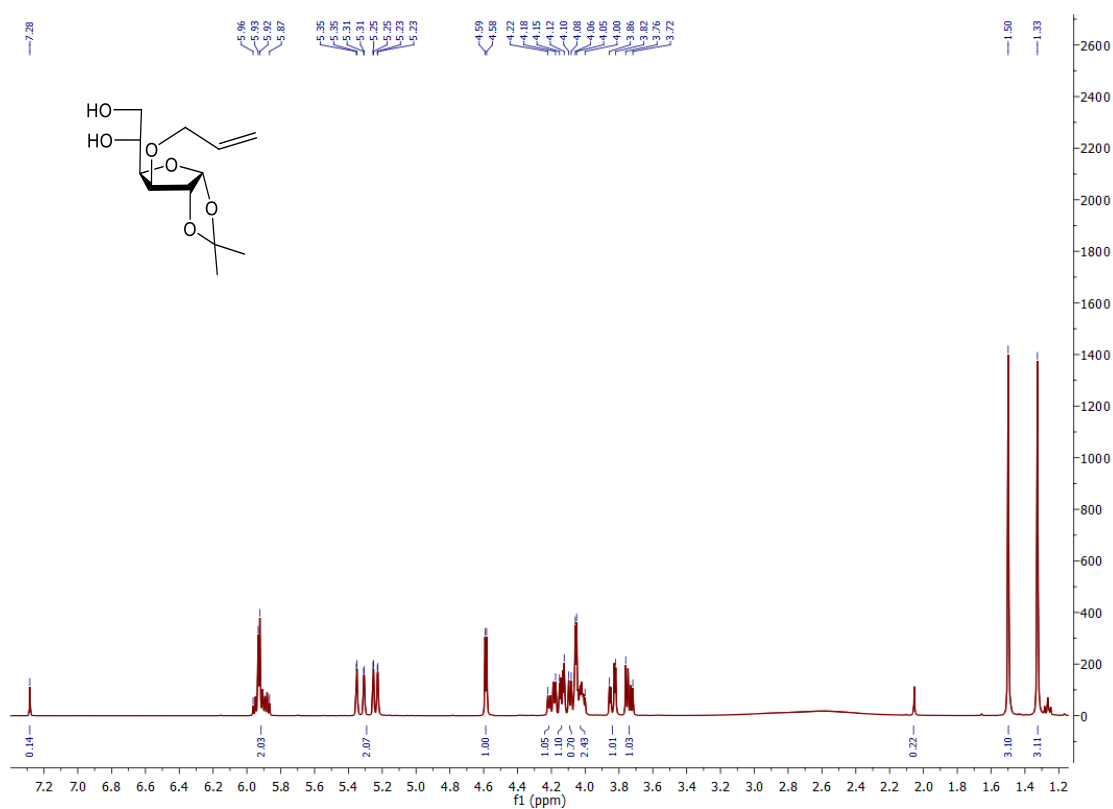


Anexo A 1.1.4. Espetro de HSQC

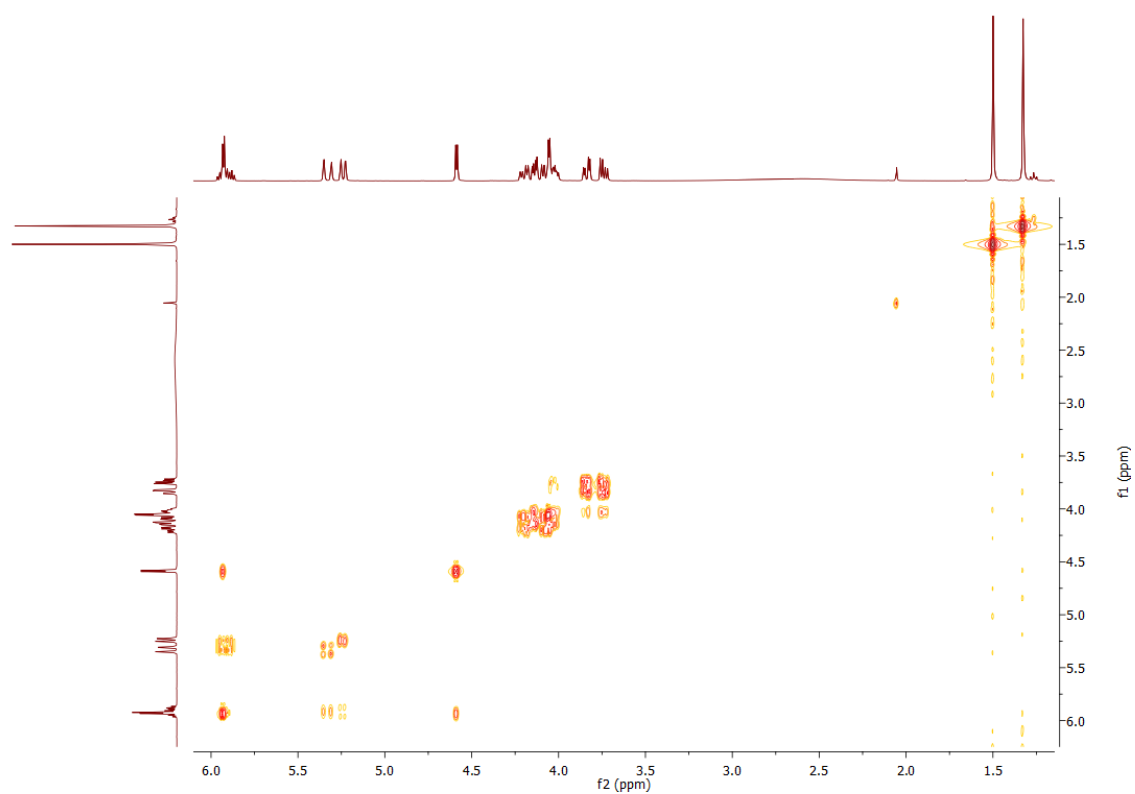


A1.2. Espetros de RMN do composto 6

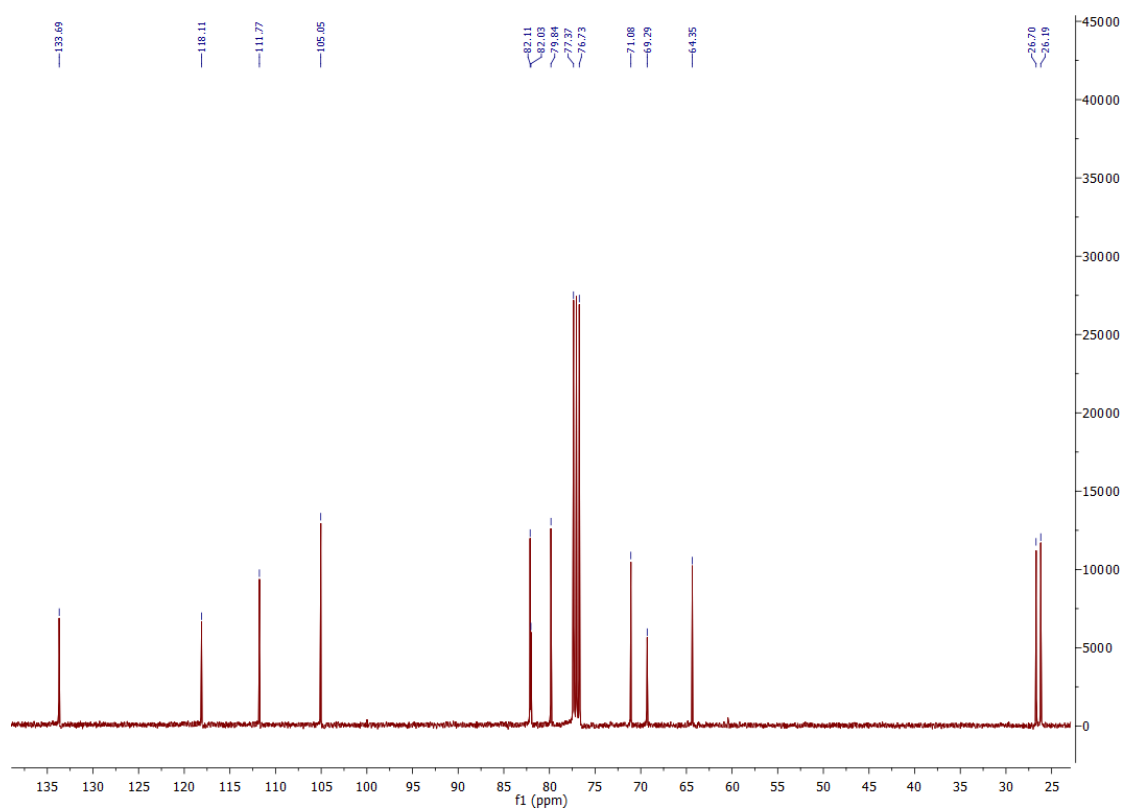
Anexo A 1.2.1. Espetro de ¹H-RMN



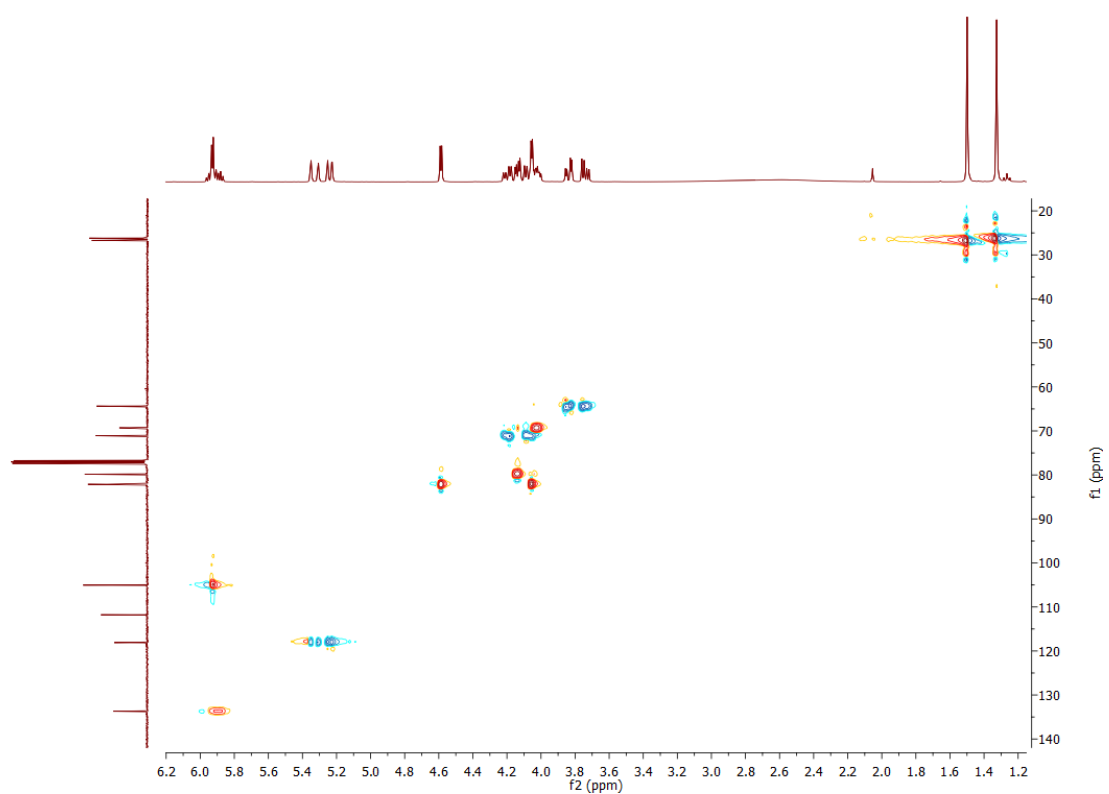
Anexo A 1.2.2. Espectro de COSY



Anexo A 1.2.3. Espectro de ^{13}C -RMN

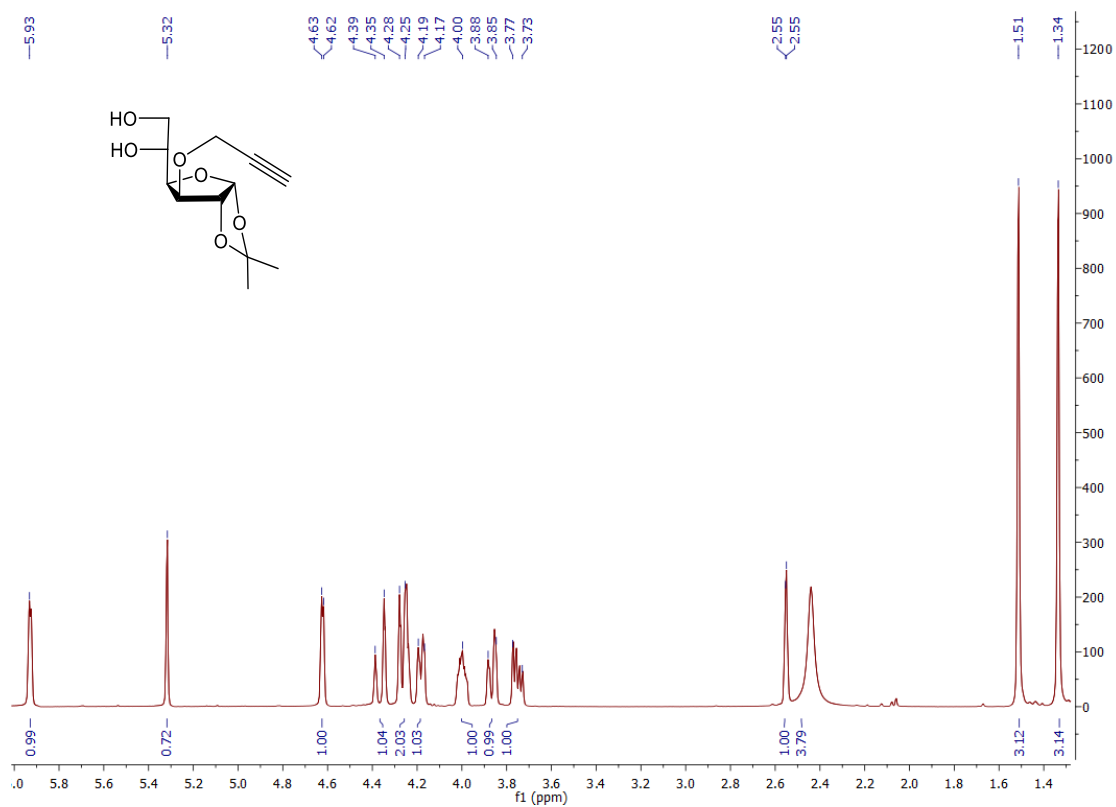


Anexo A 1.2.3. Espectro de HSQC

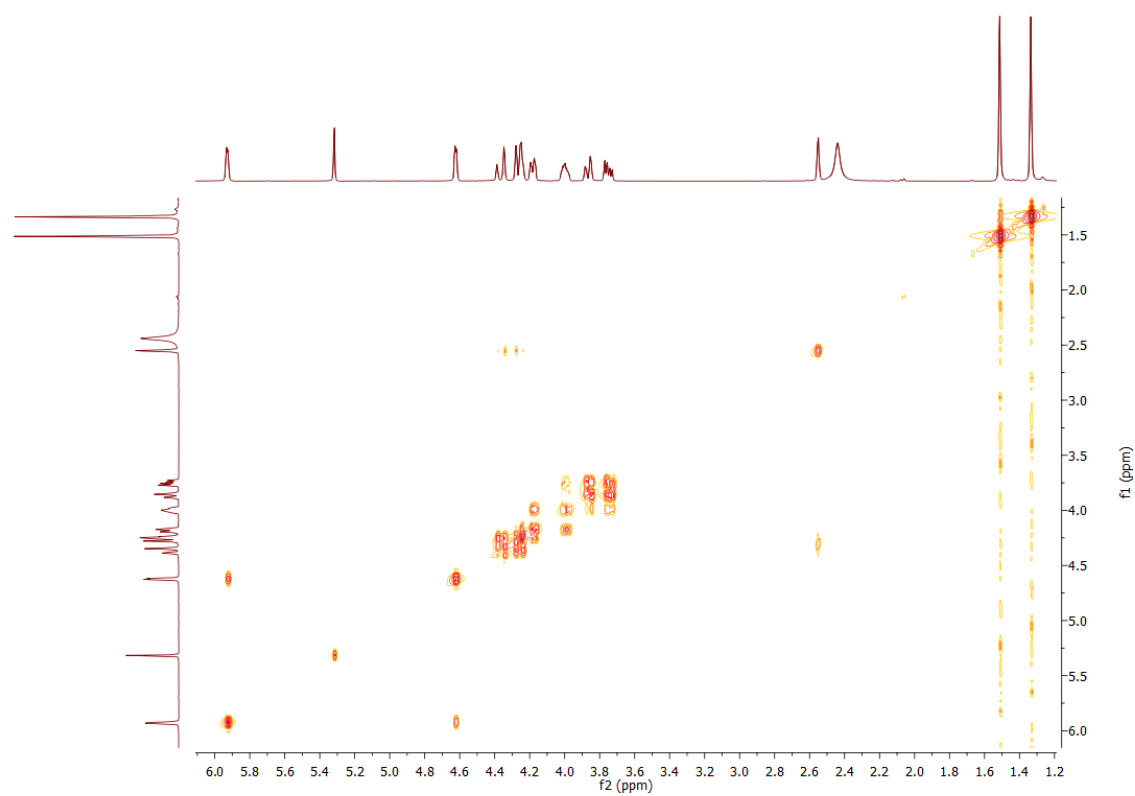


A1.3. Espectros de RMN do composto 7

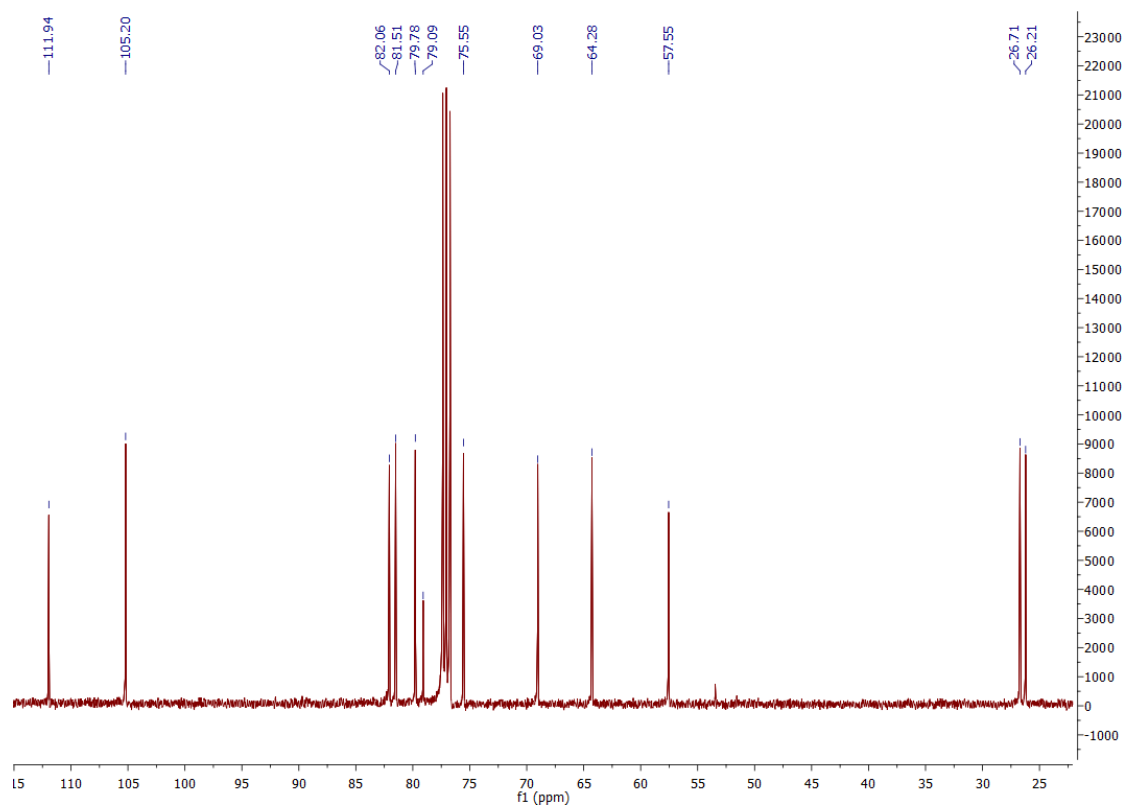
Anexo A 1.3.1. Espectro de ^1H -RMN



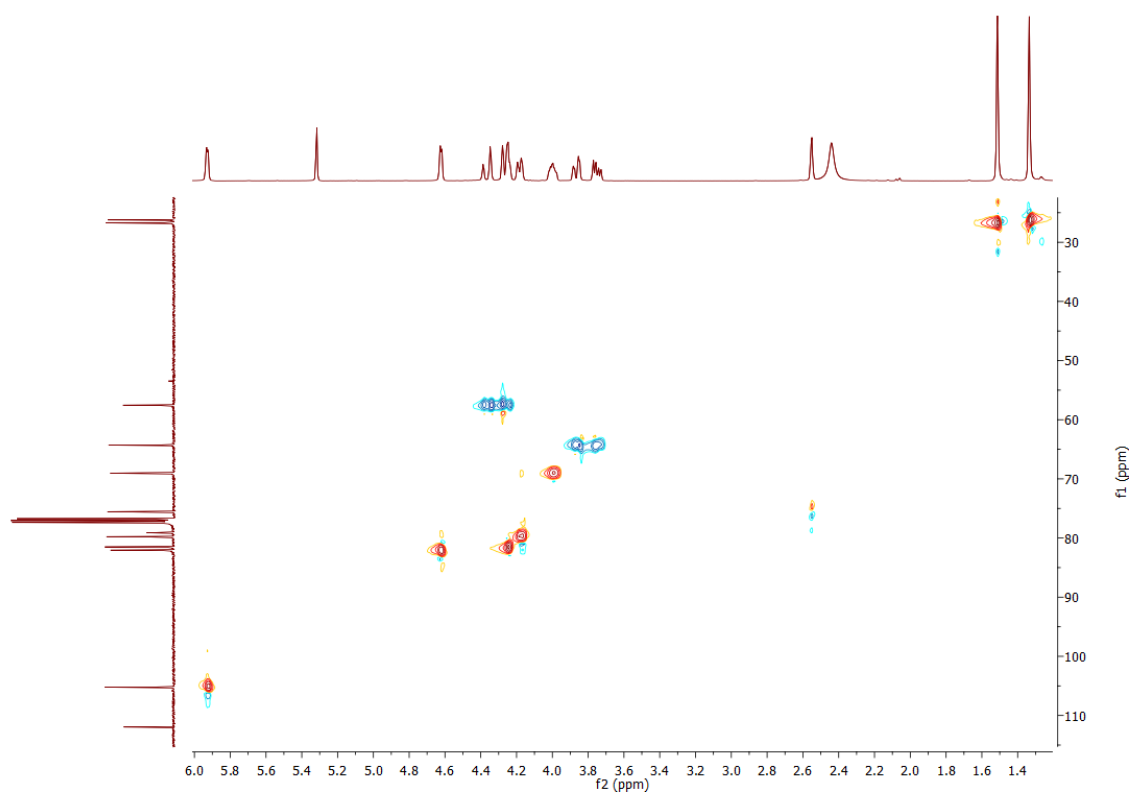
Anexo A 1.3.2. Espectro de COSY



Anexo A 1.3.3. Espectro de ^{13}C -RMN

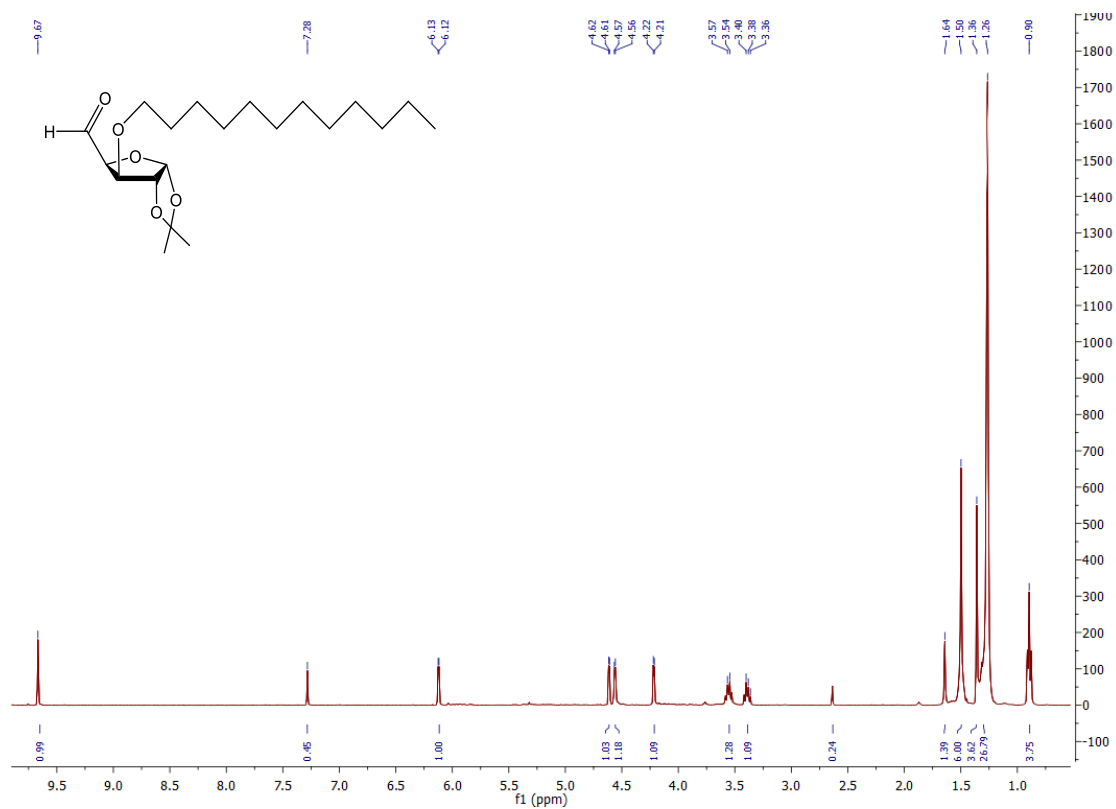


Anexo A 1.3.4. Espetro de HSCQ

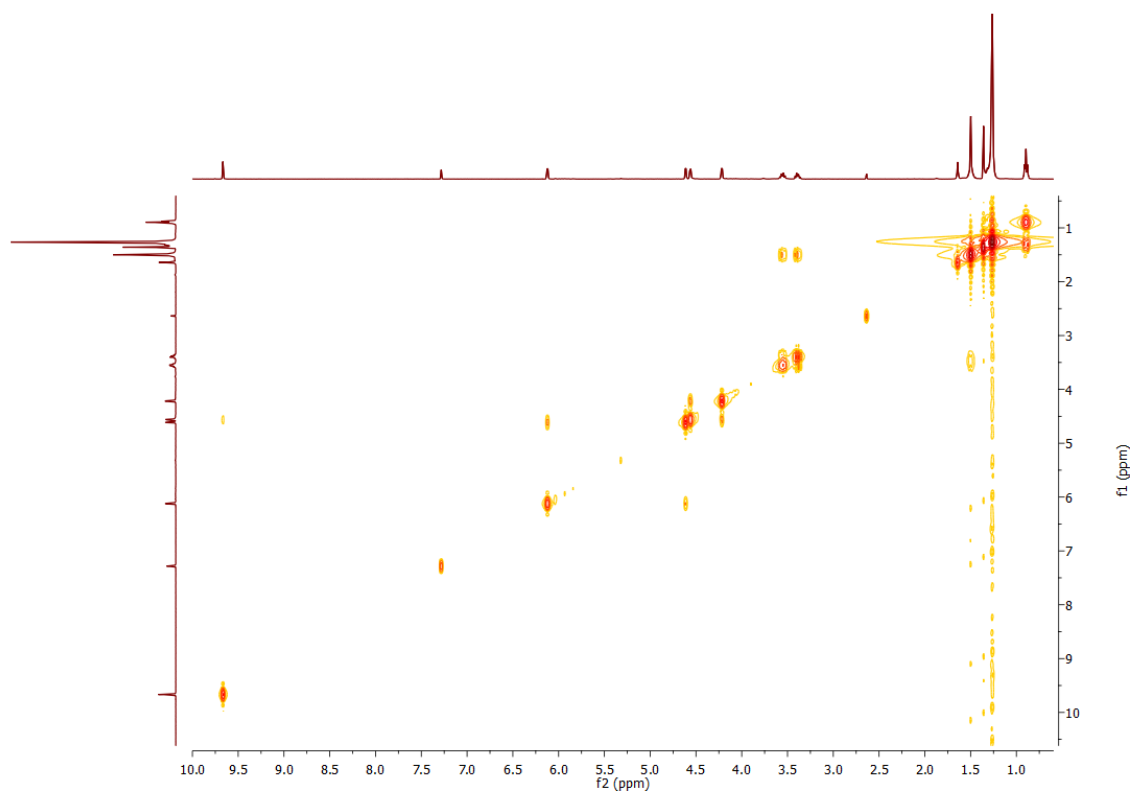


A1.4. Espetros de RMN do composto 8

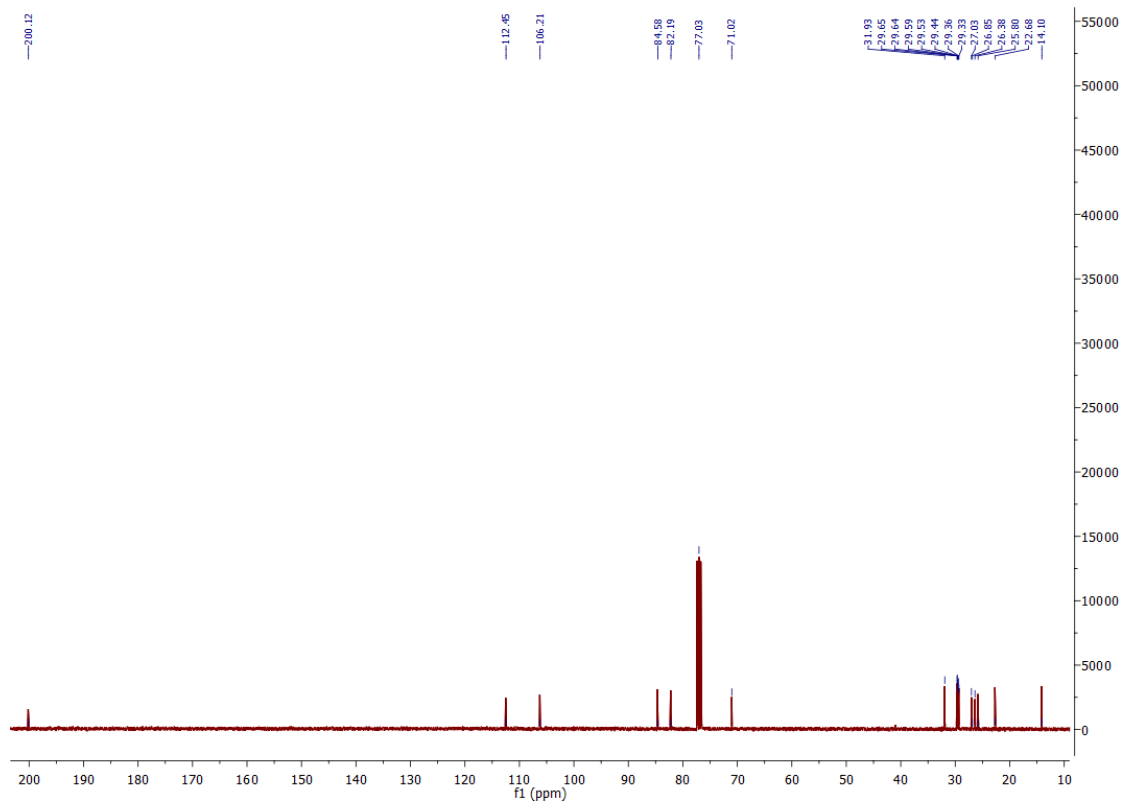
Anexo A 1.4.1. Espetro de ^1H -RMN



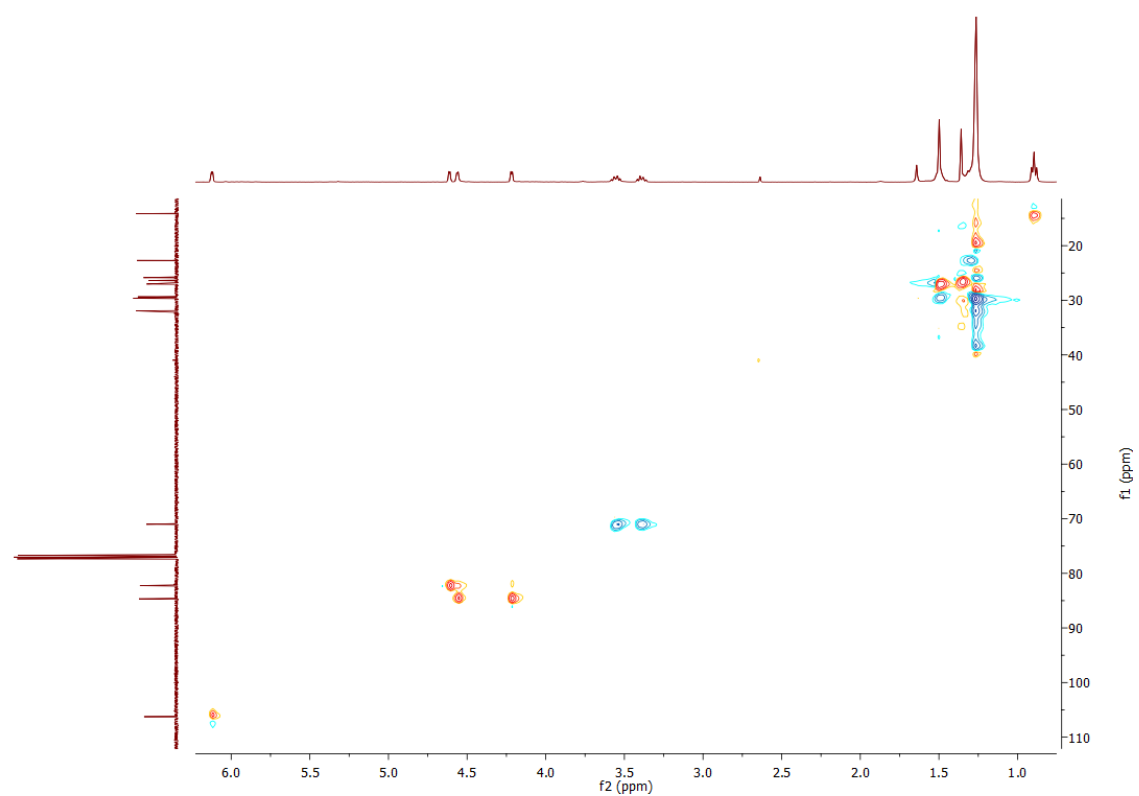
Anexo A 1.4.2. Espetro de COSY



Anexo A 1.4.3. Espetro de ^{13}C -RMN

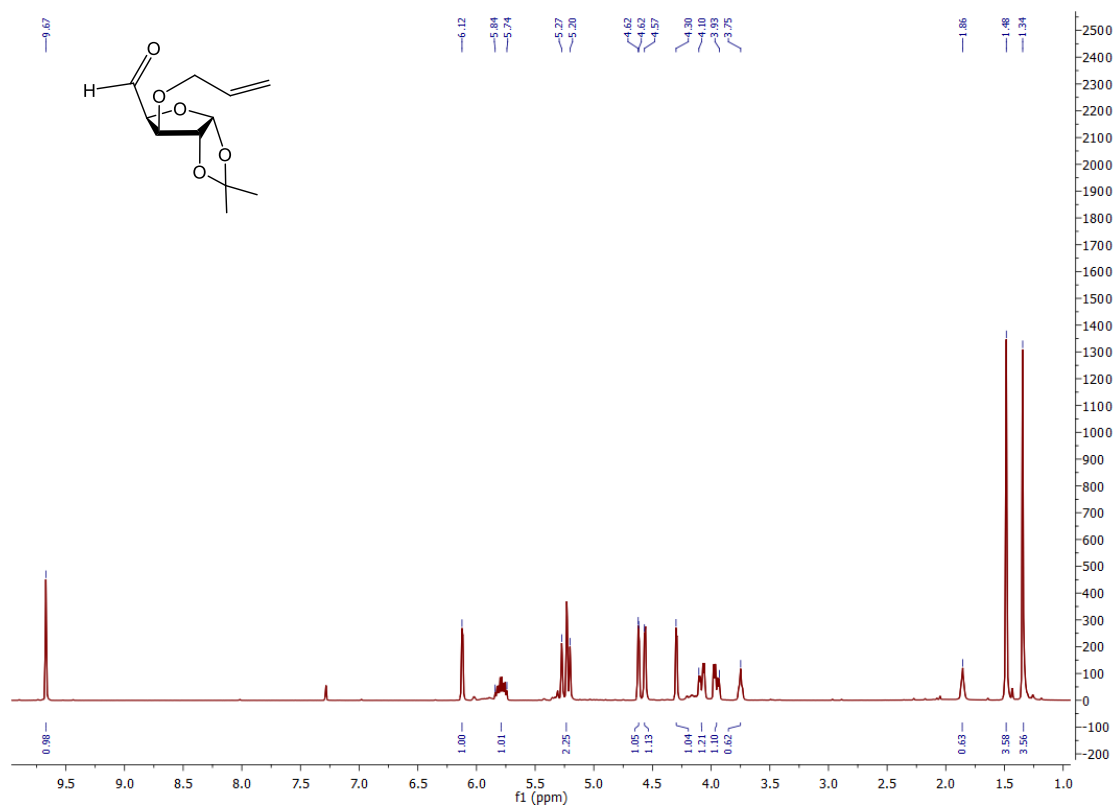


Anexo A 1.4.4. Espectro de HSQC.

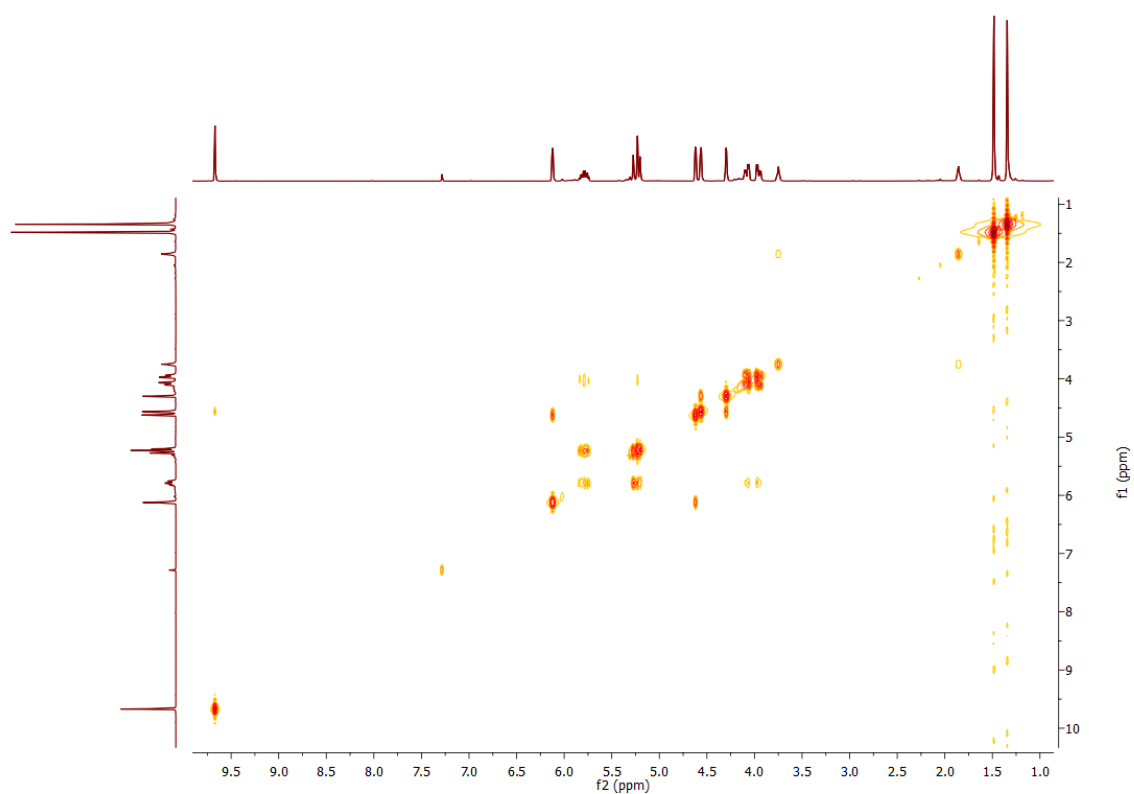


A1.5. Espectros de RMN do composto 9

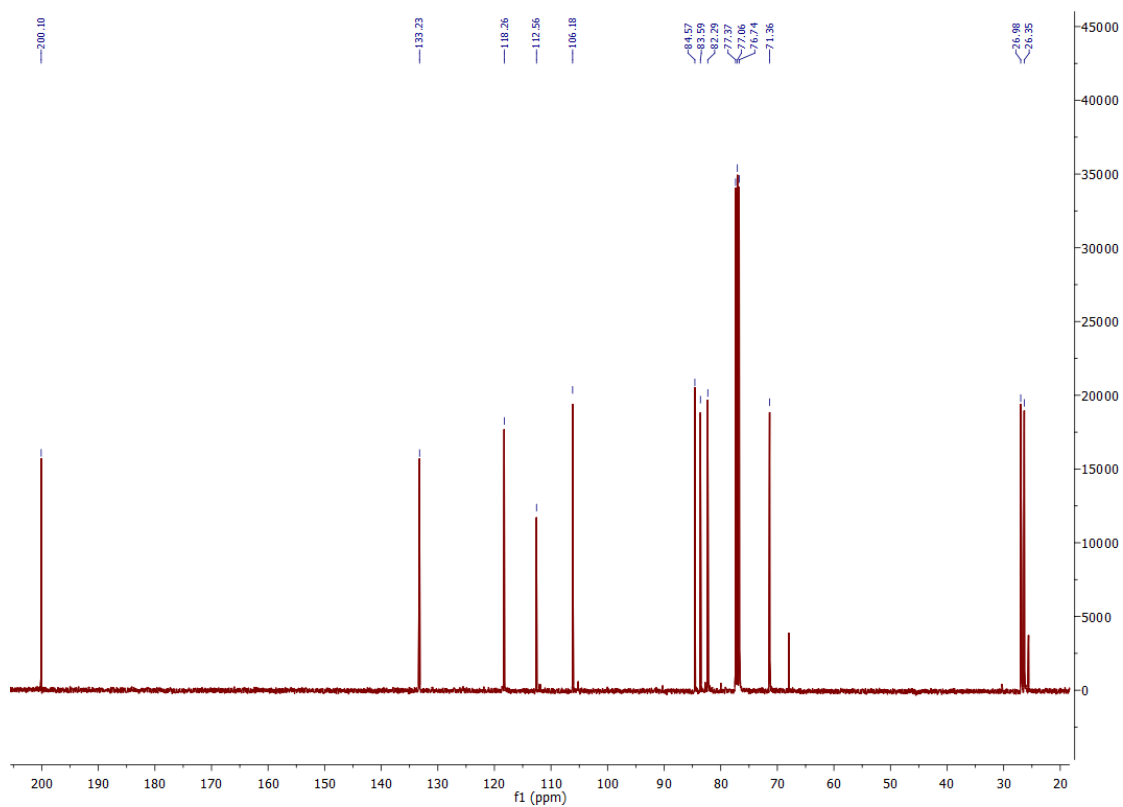
Anexo A 1.5.1. Espectro de ^1H -RMN



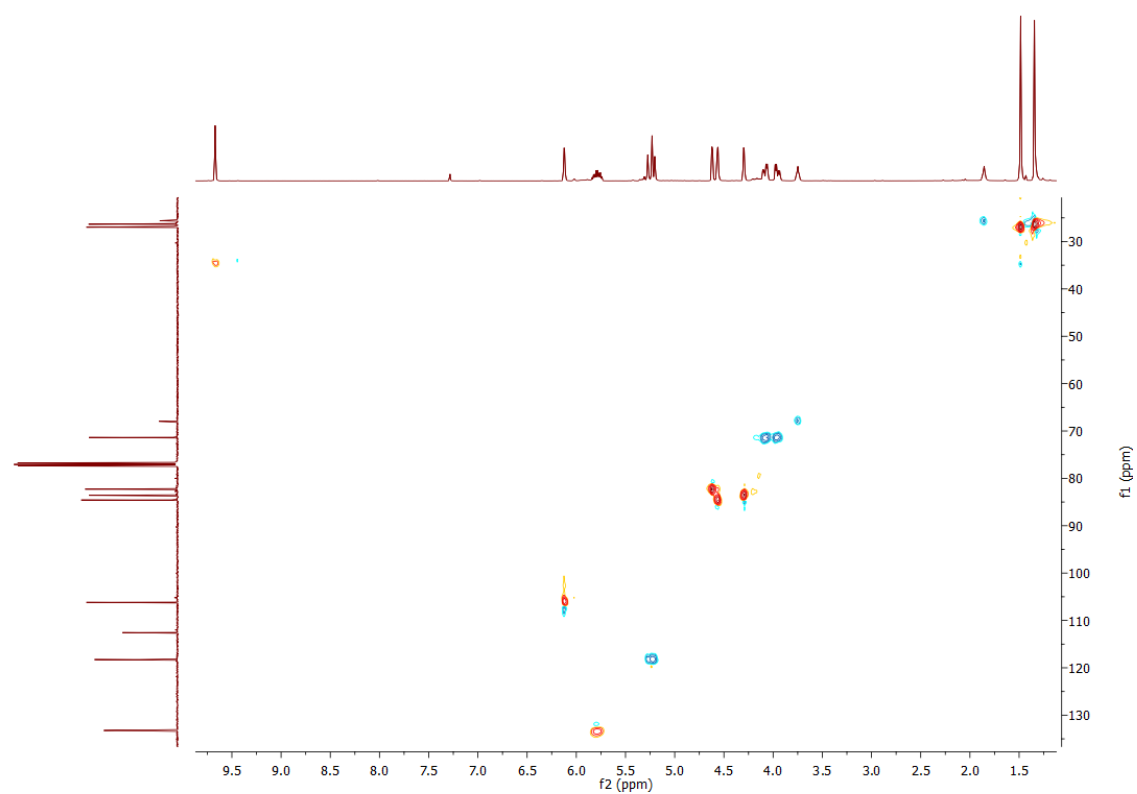
Anexo A 1.5.2. Espectro de COSY



Anexo A 1.5.3. Espectro de ^{13}C -RMN

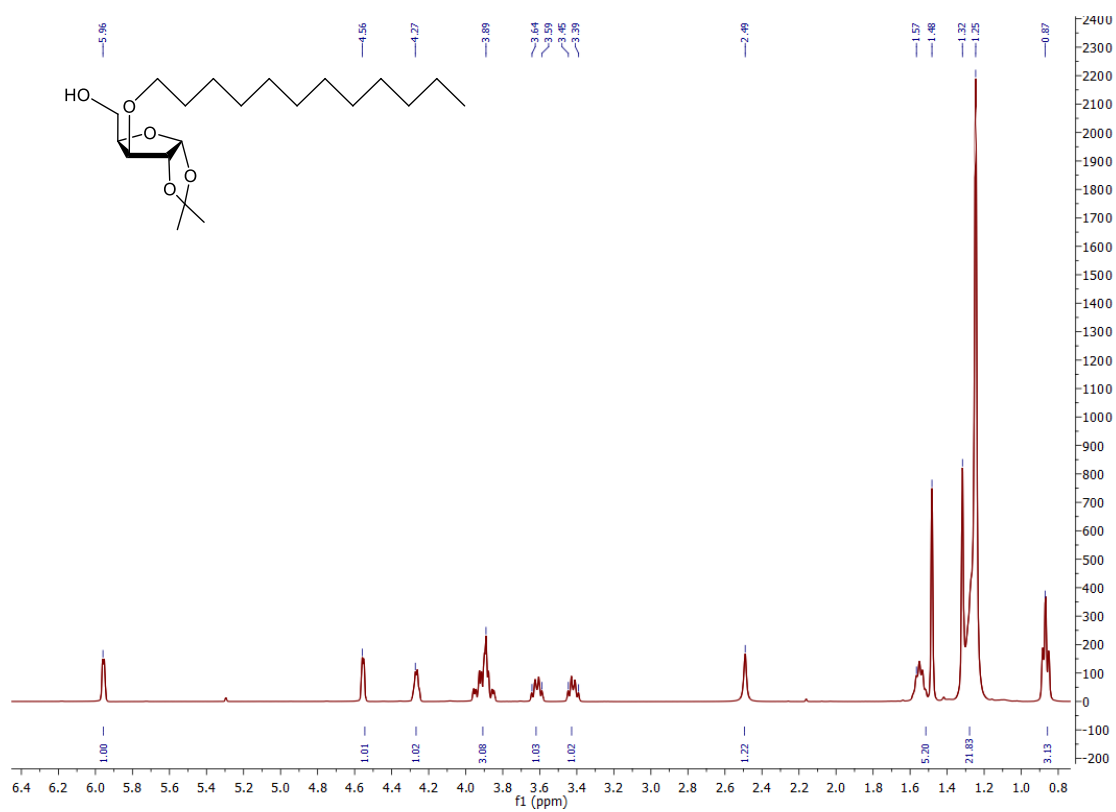


Anexo A 1.5.3. Espetro de HSQC

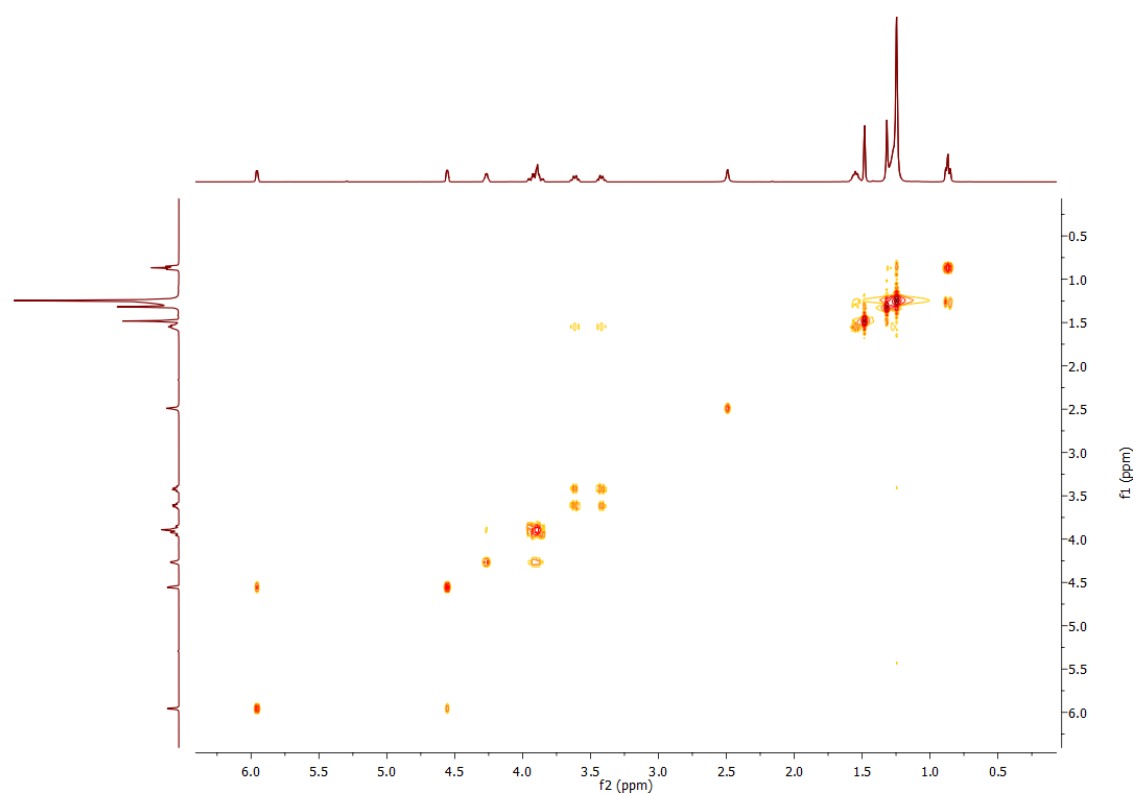


A1.6. Espetros de RMN do composto 12

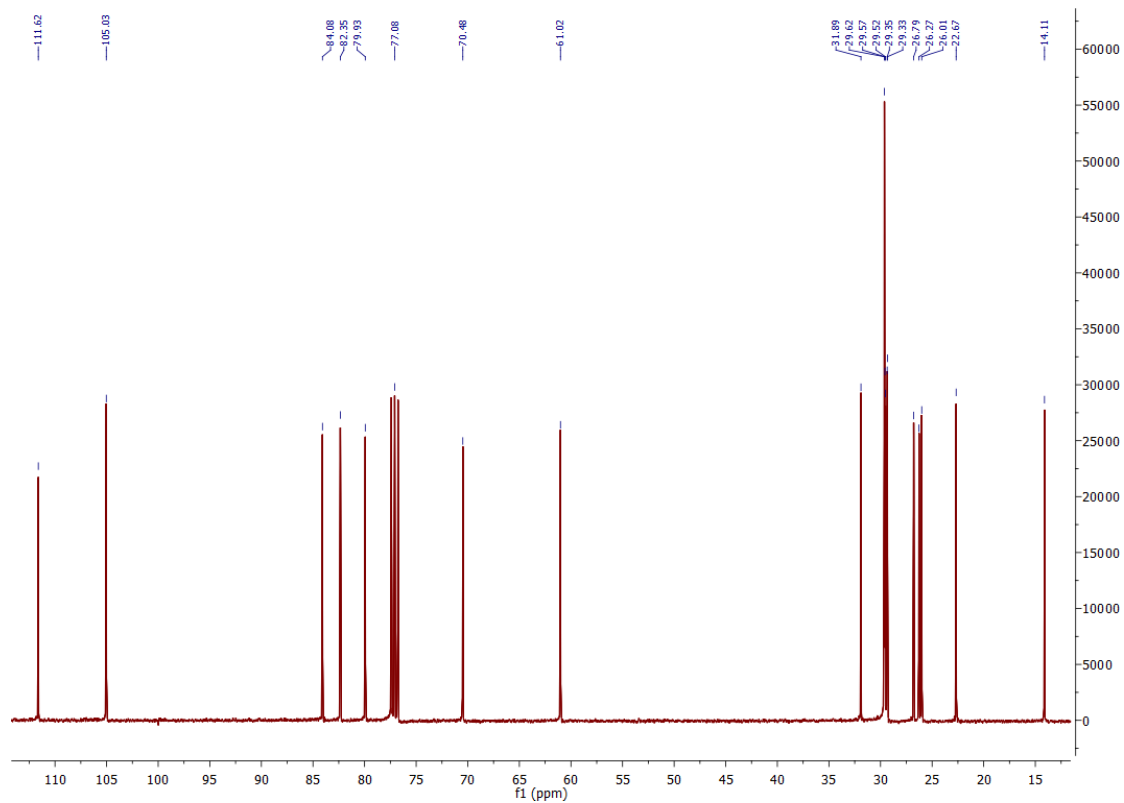
Anexo A 1.6.1. Espetro de ^1H -RMN



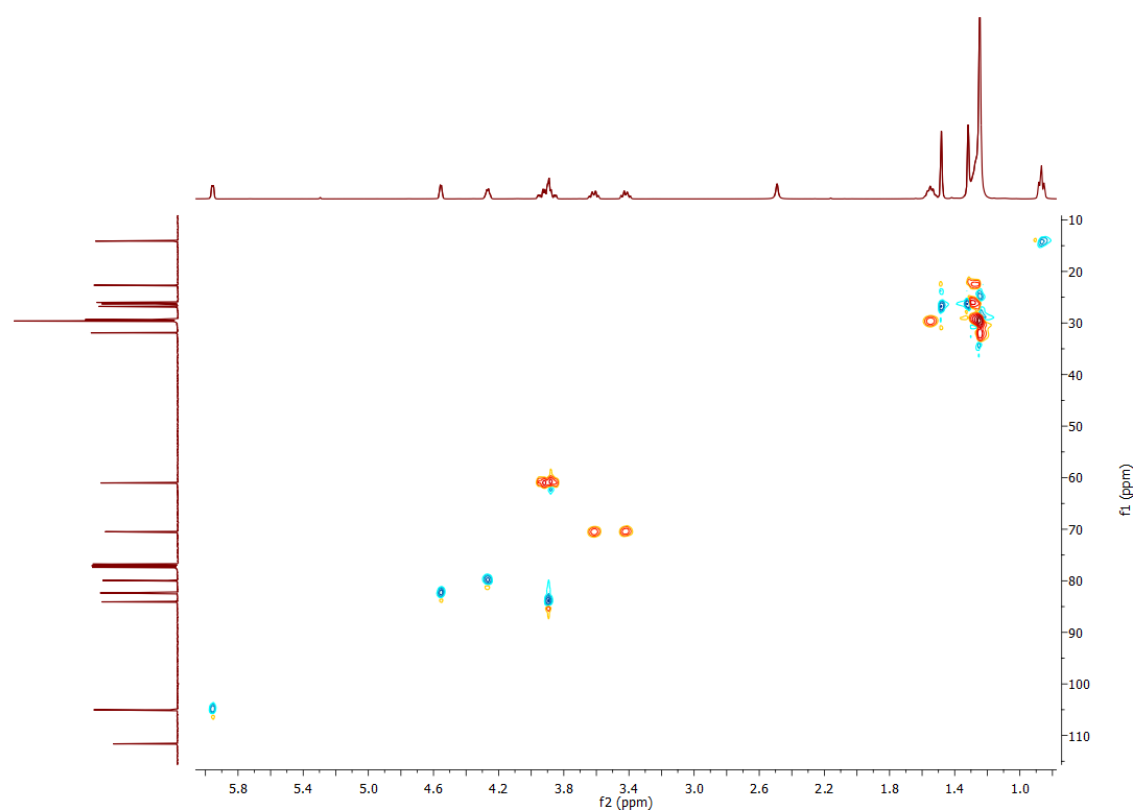
Anexo A 1.6.2. Espetro de COSY



Anexo A 1.6.3. Espetro de ^{13}C -RMN

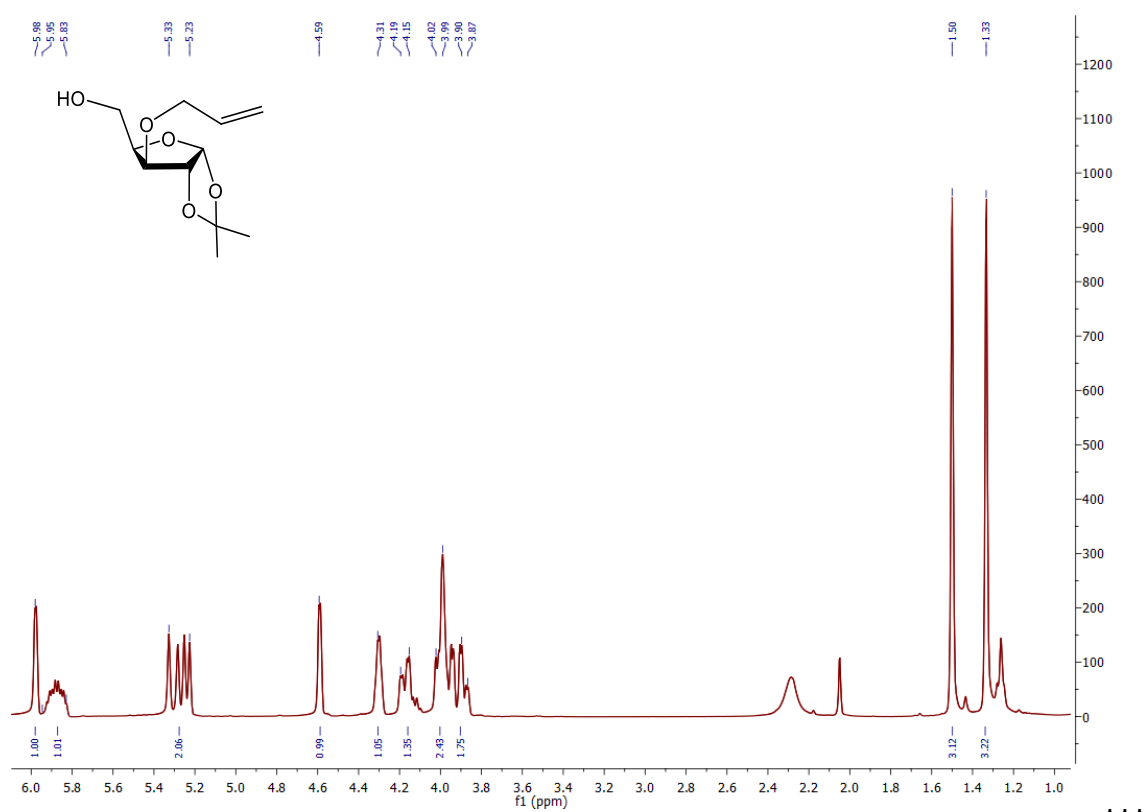


Anexo A 1.6.3. Espetro de HSQC

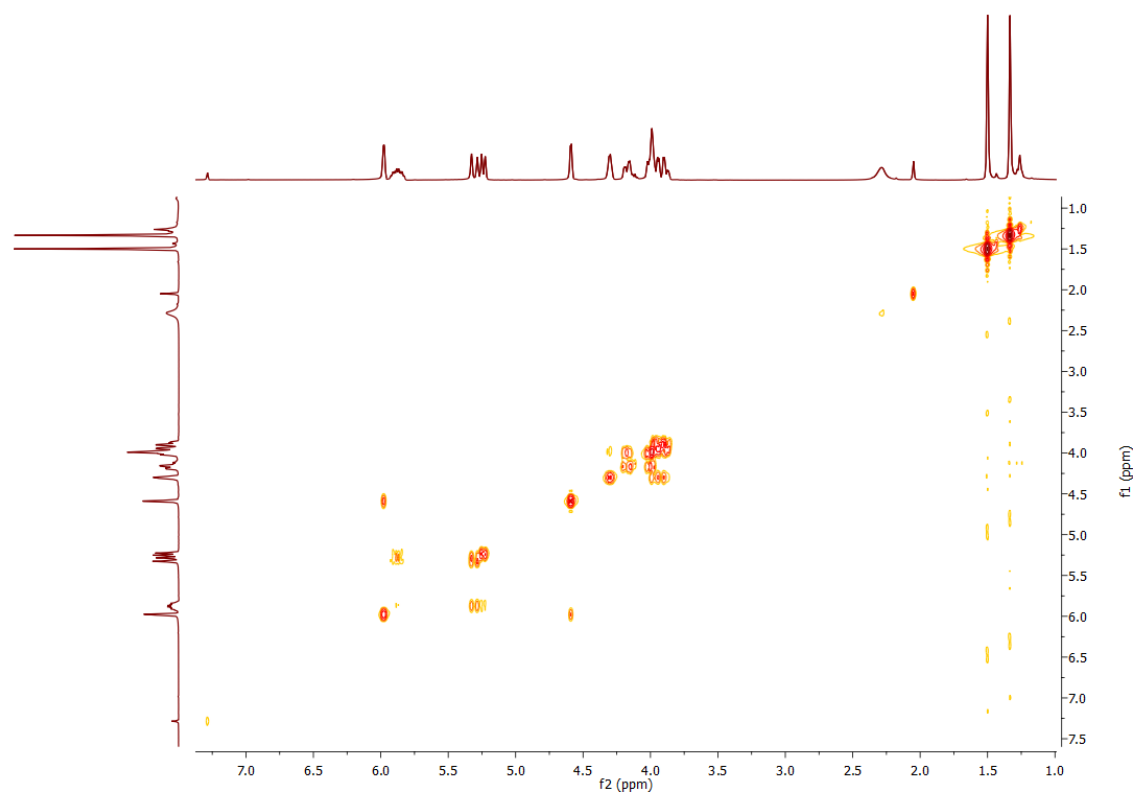


A1.7. Espetros de RMN do composto 13

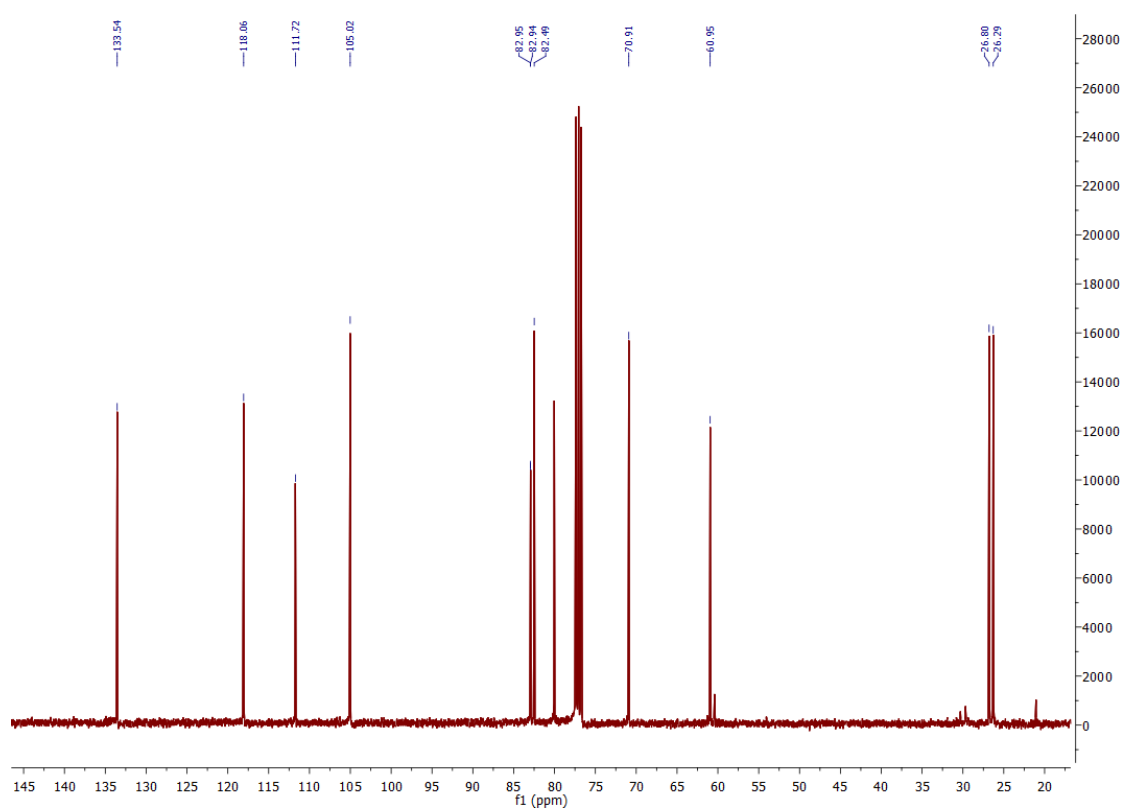
Anexo A 1.7.1. Espetro de ^1H -RMN



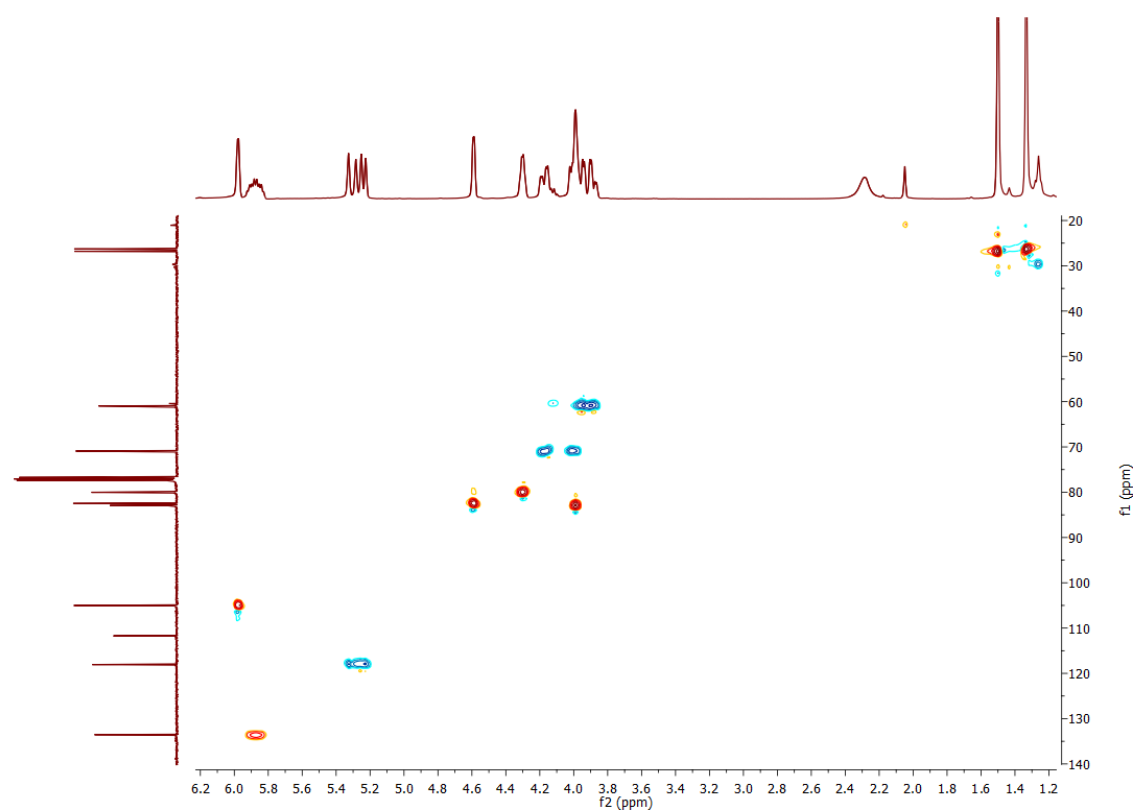
Anexo A 1.7.2. Espectro de COSY



Anexo A 1.7.3. Espectro de ^{13}C -RMN

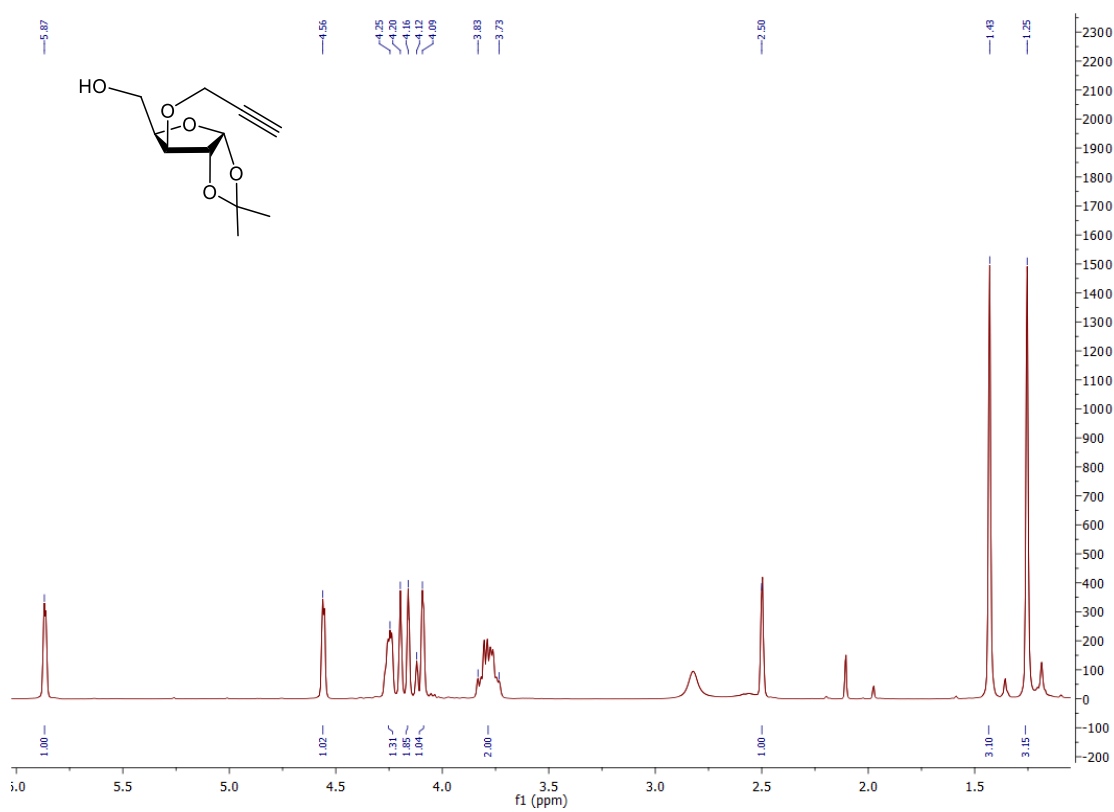


Anexo A 1.7.4. Espectro de HSQC

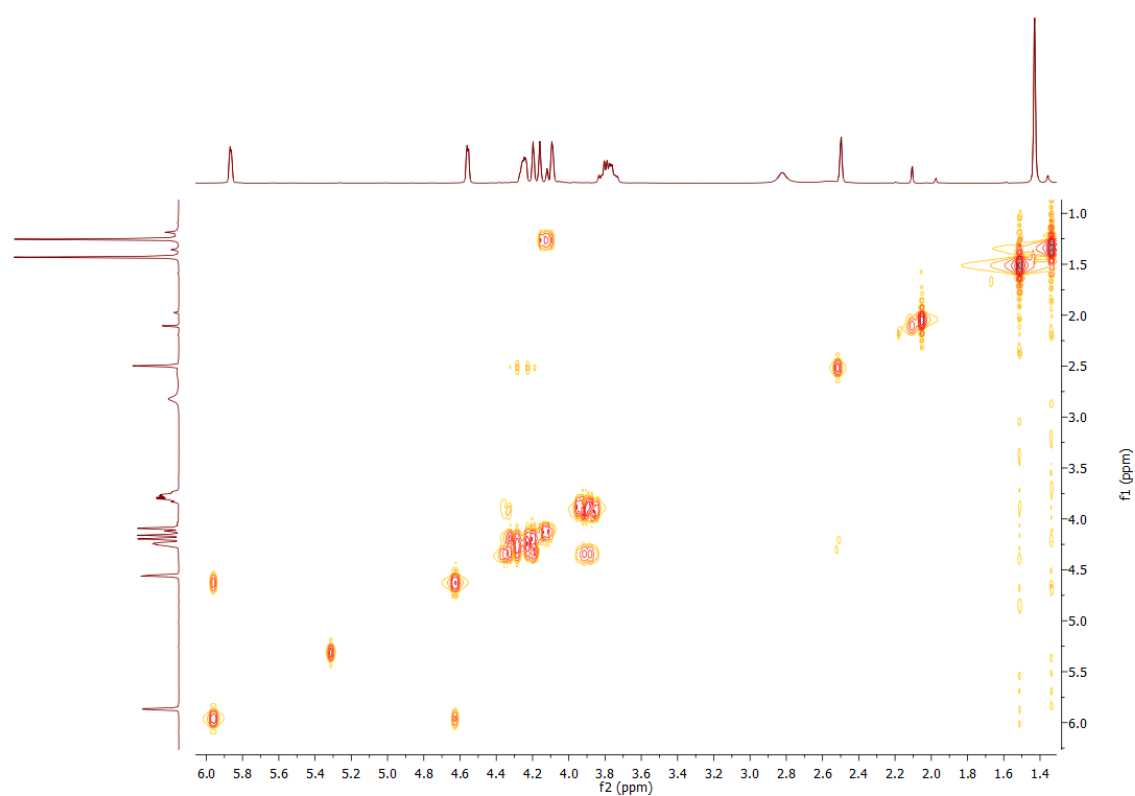


A1.8. Espectros de RMN do composto 14

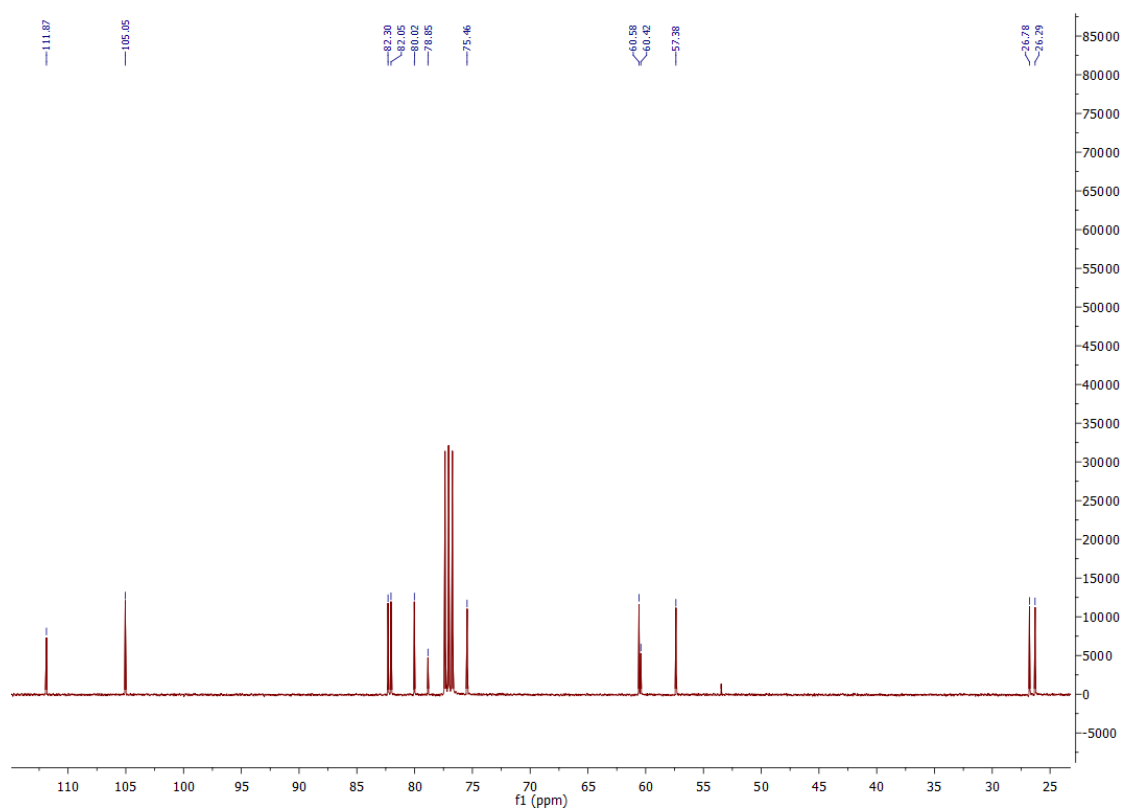
Anexo A 1.8.1. Espectro de ^1H -RMN



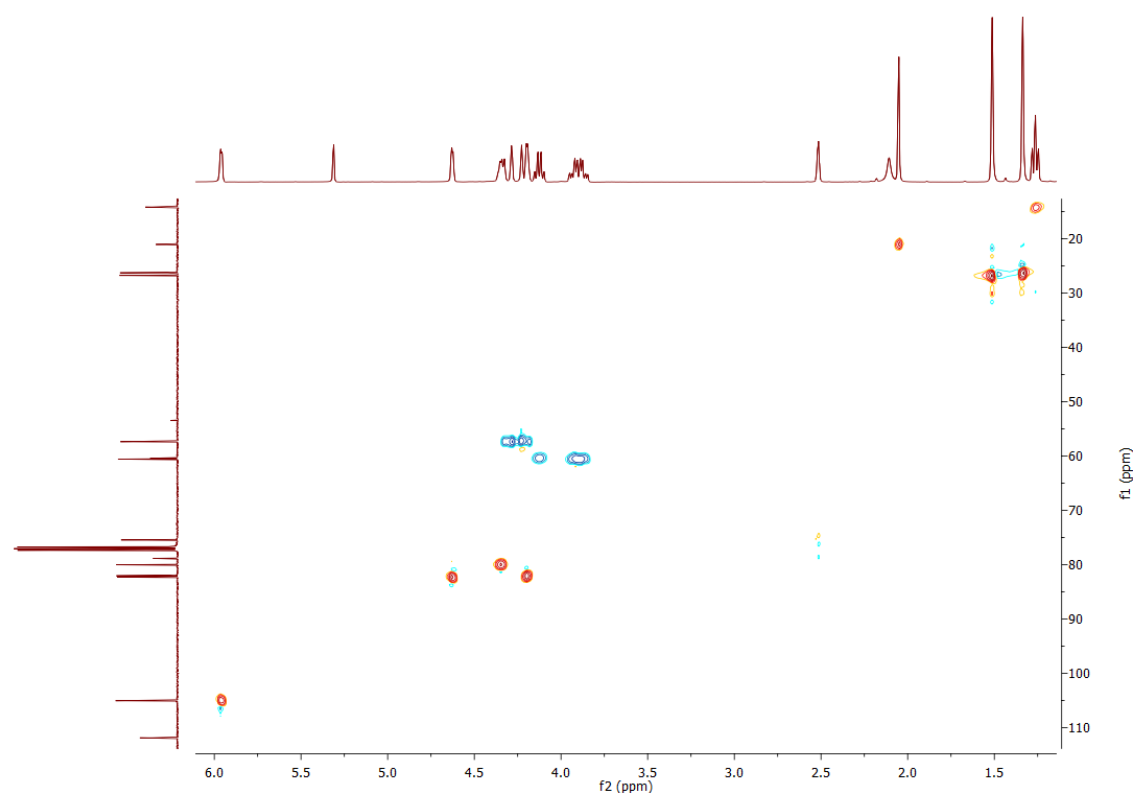
Anexo A 1.8.2. Espetro de COSY



Anexo A 1.8.3. Espetro de ^{13}C -RMN

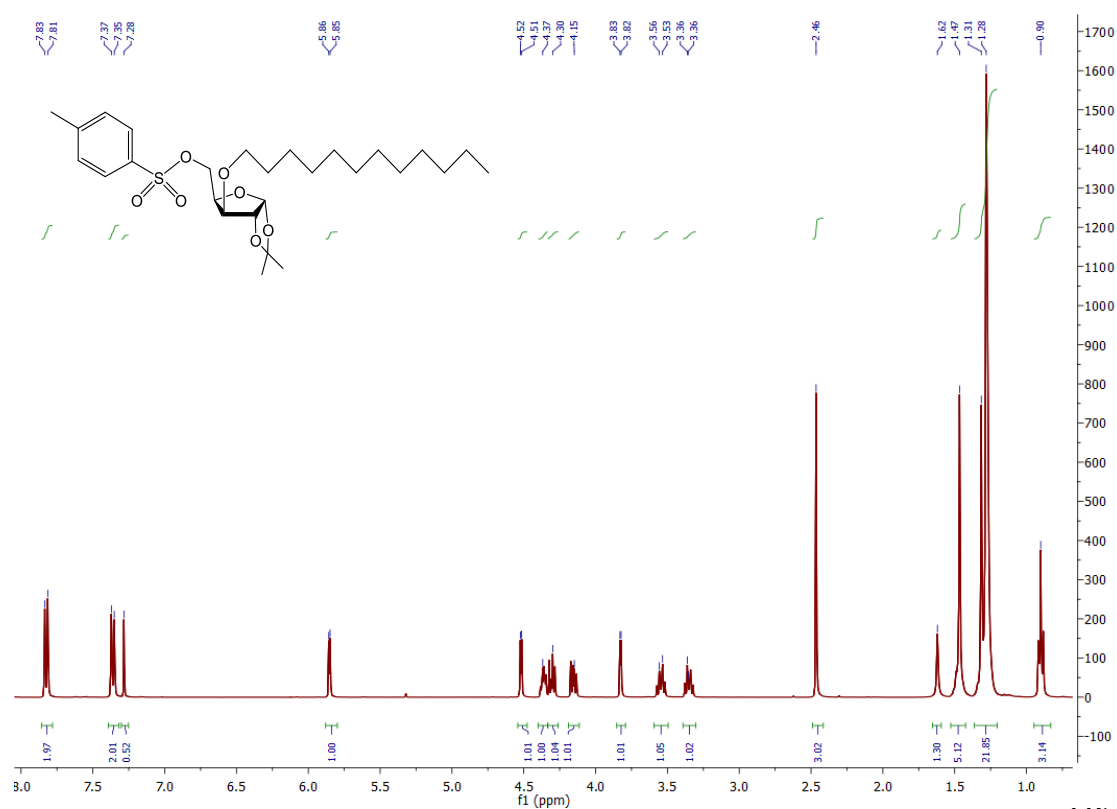


Anexo A 1.8.4. Espectro de HSQC

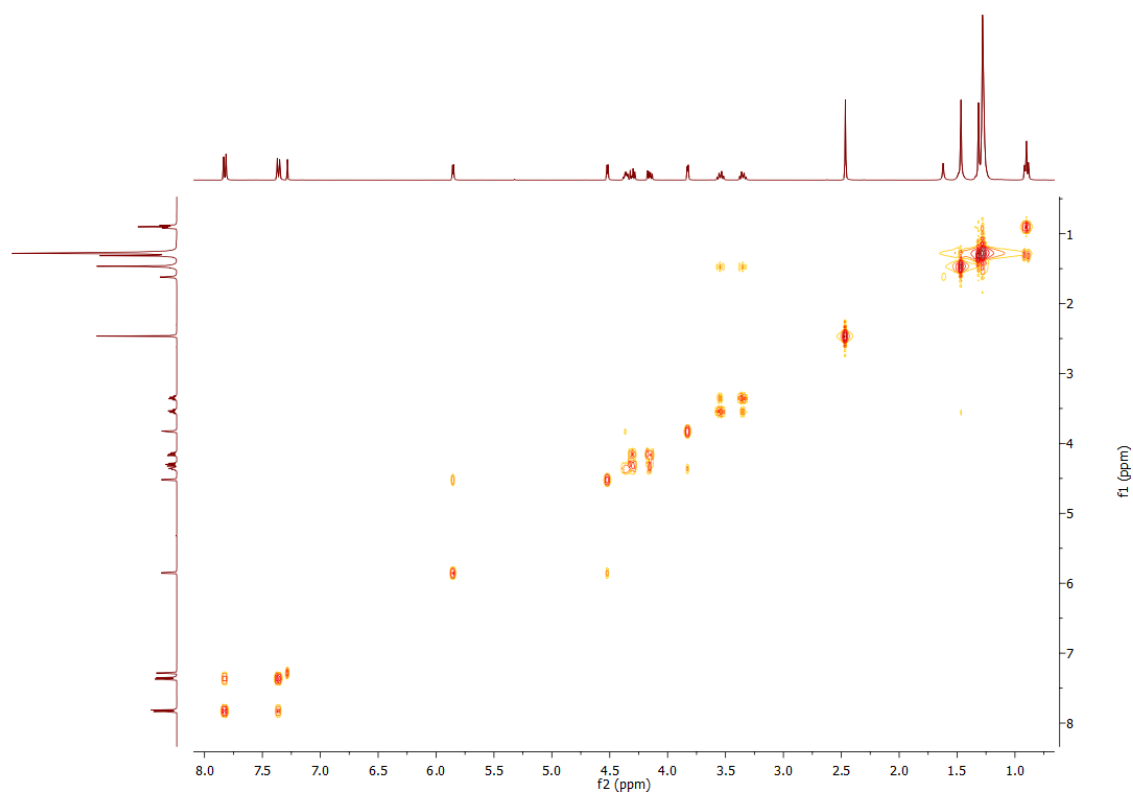


A1.9. Espectros de RMN do composto 16

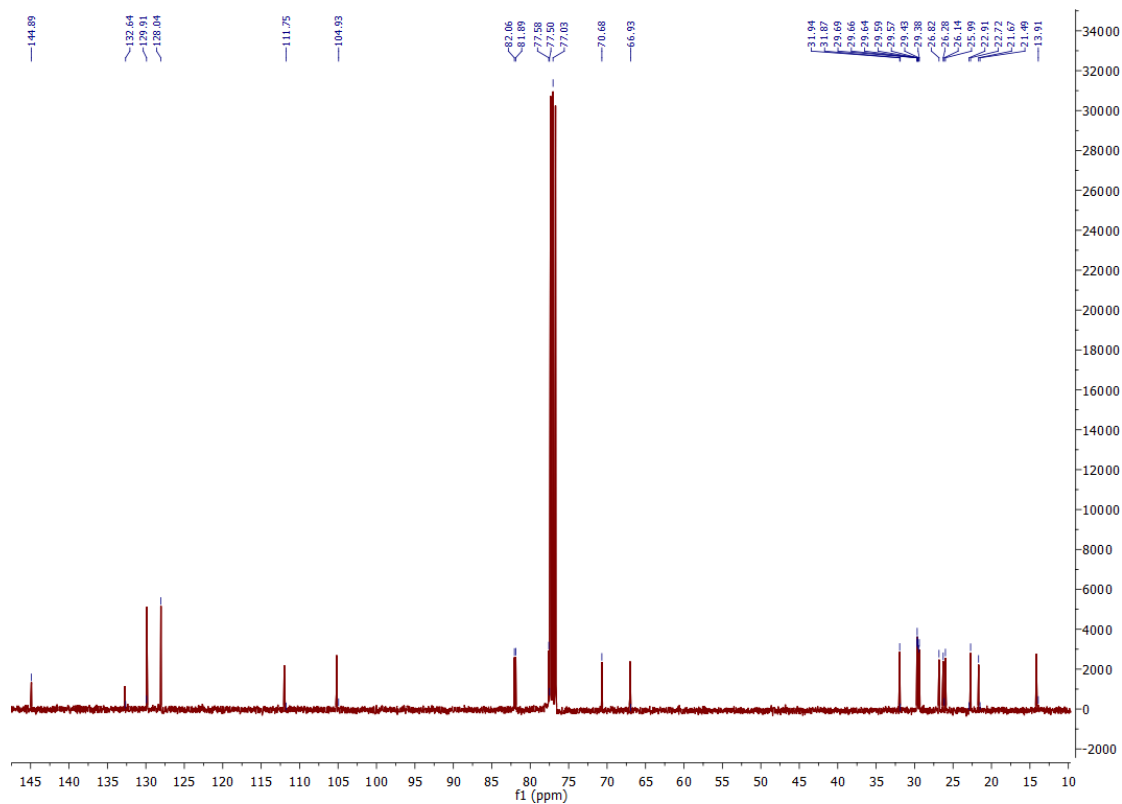
Anexo A 1.9.1. Espectro de ^1H -RMN



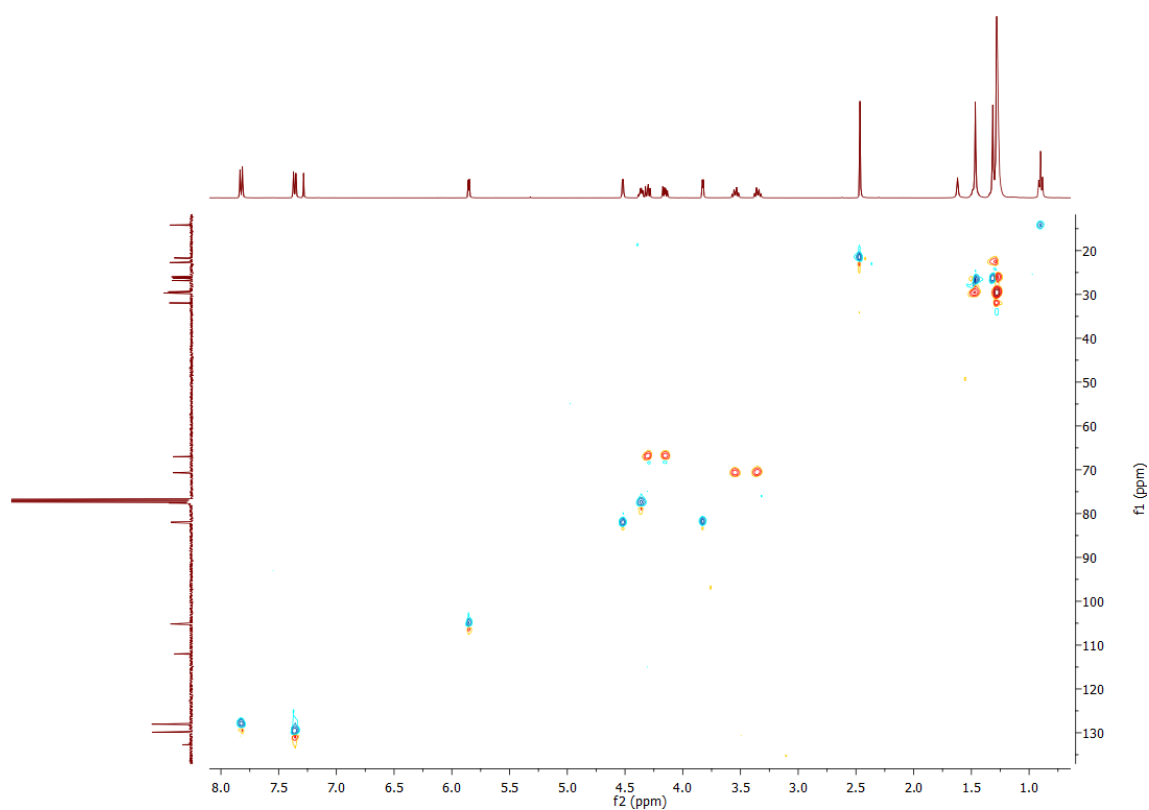
Anexo A 1.9.2. Espetro de COSY



Anexo A 1.9.3. Espetro de ^{13}C -RMN

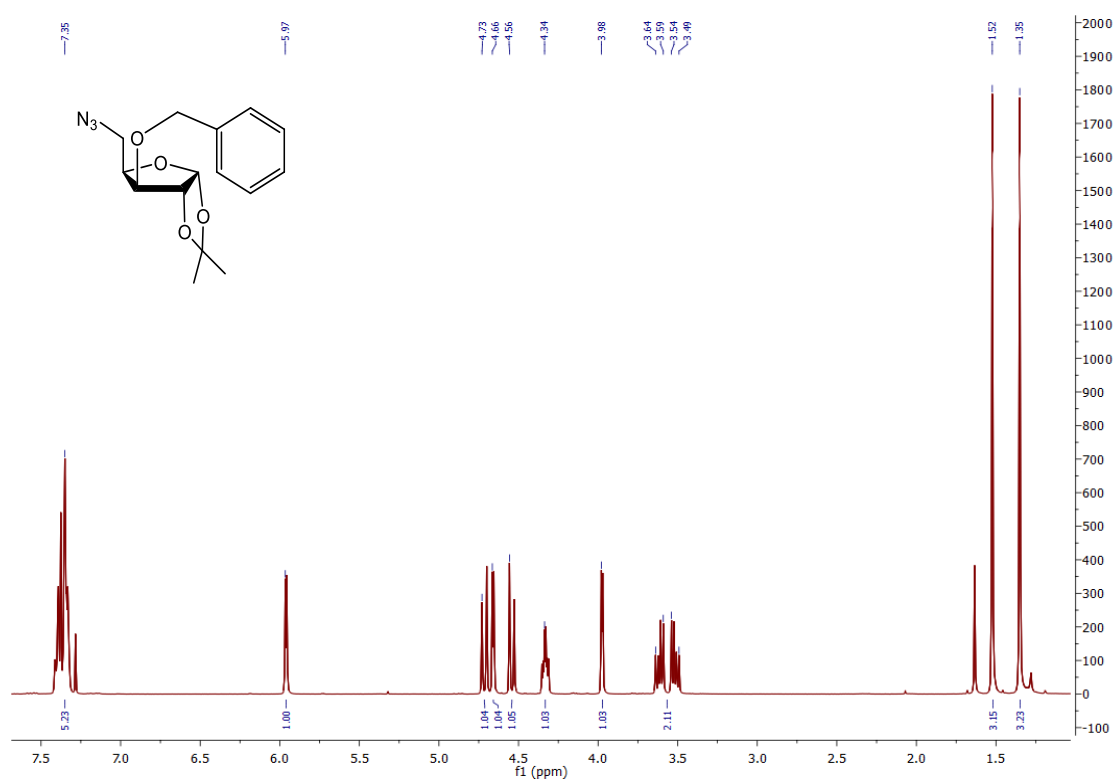


Anexo A 1.9.4. Espectro de HSQC



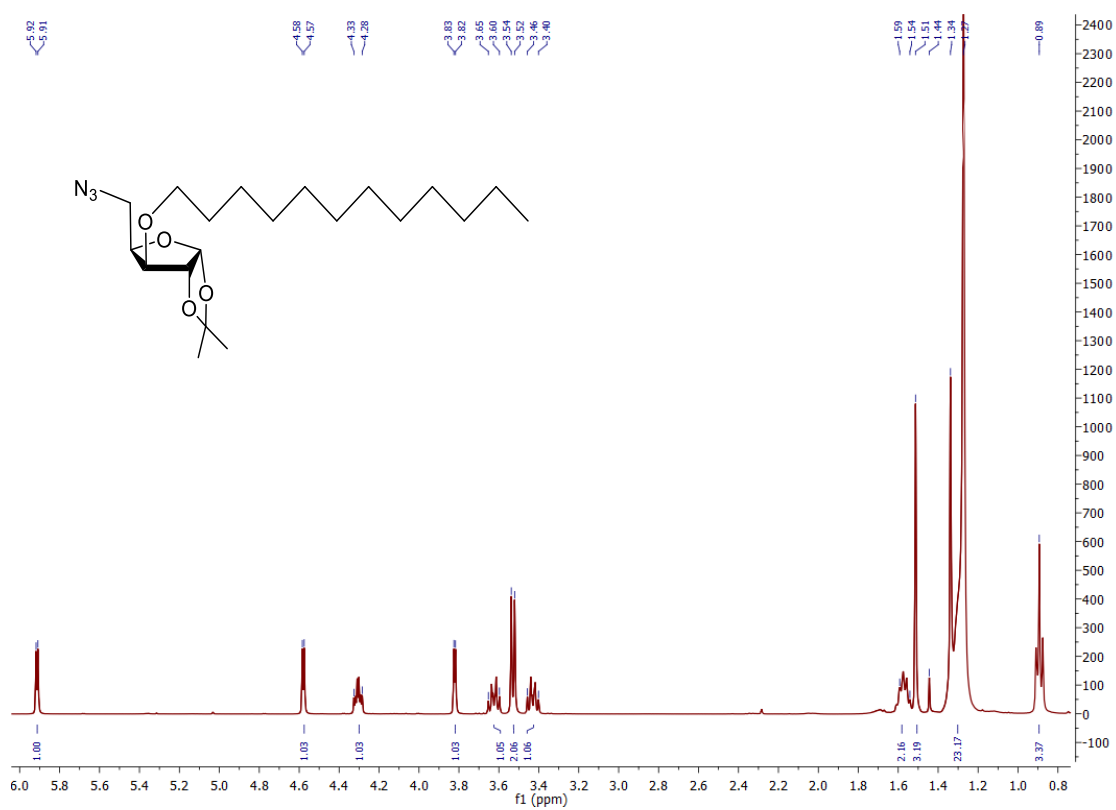
A1.10. Espectros de RMN do composto 17

Anexo A 1.10.1. Espectro de ^1H -RMN

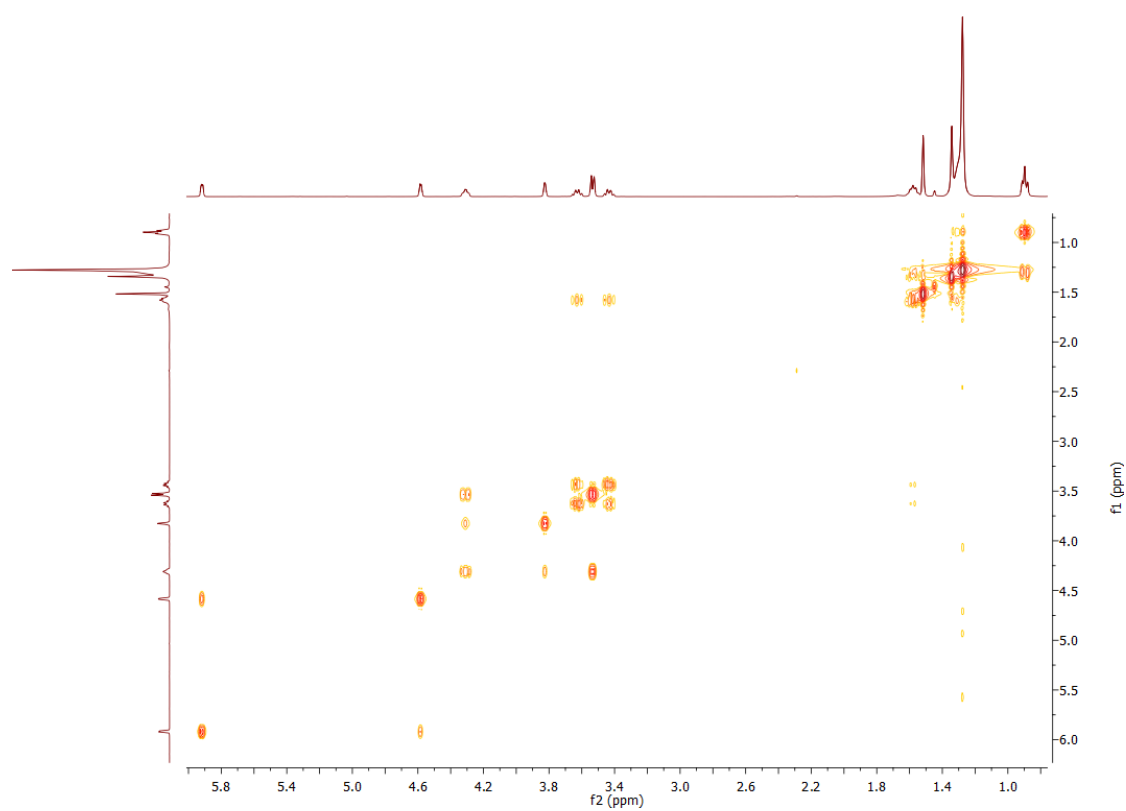


A1.11. Espetros de RMN do composto 18

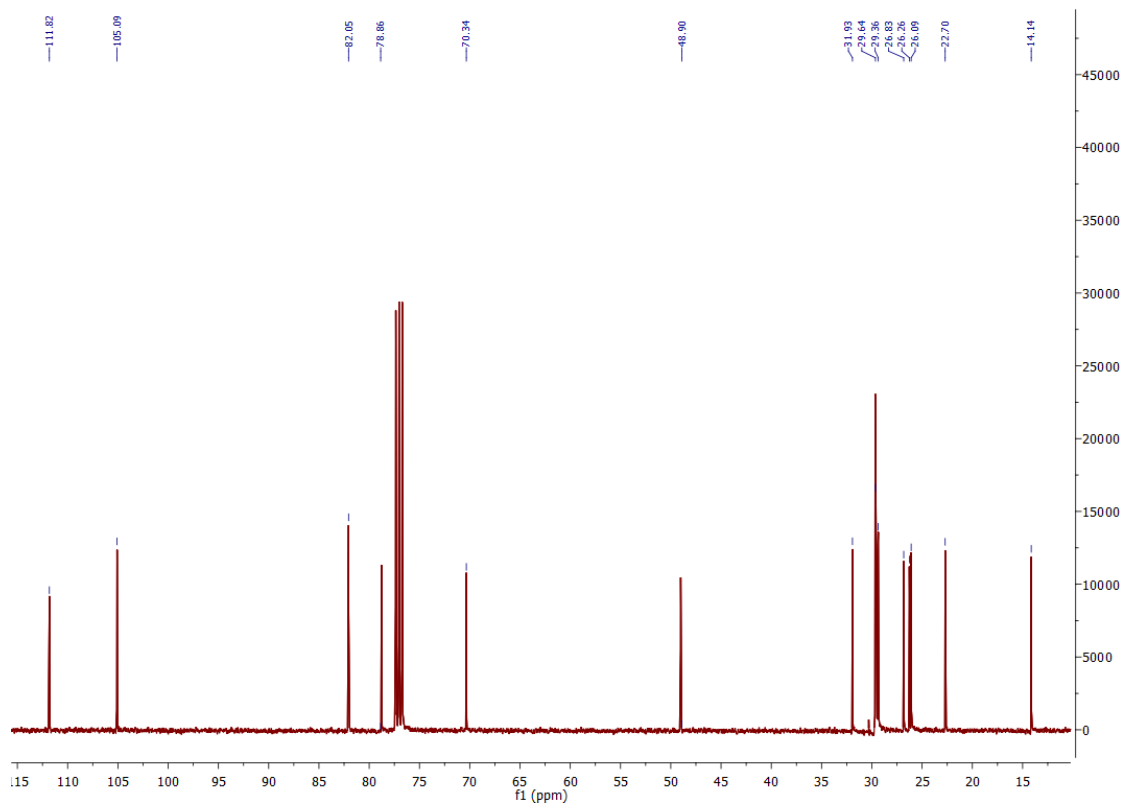
Anexo A 1.11.1. Espectro de ^1H -RMN



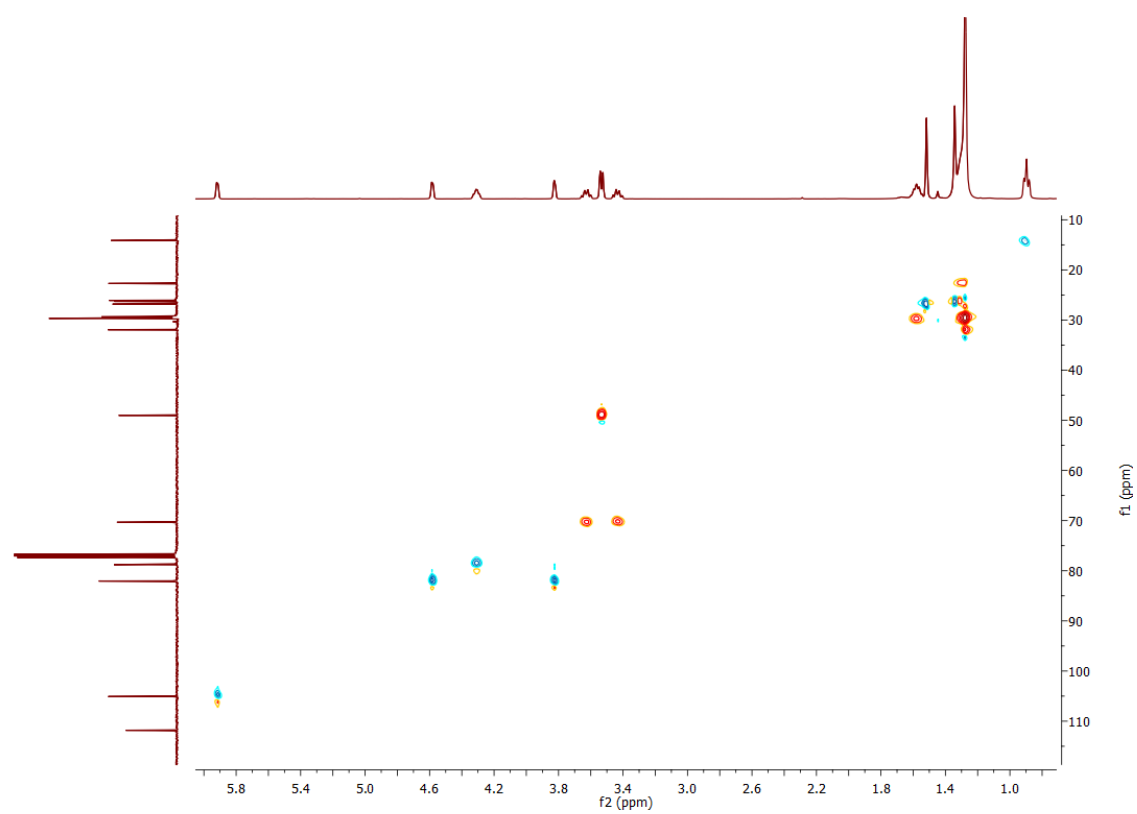
Anexo A 1.11.2. Espectro de COSY



Anexo A 1.11.3. Espetro de ^{13}C -RMN

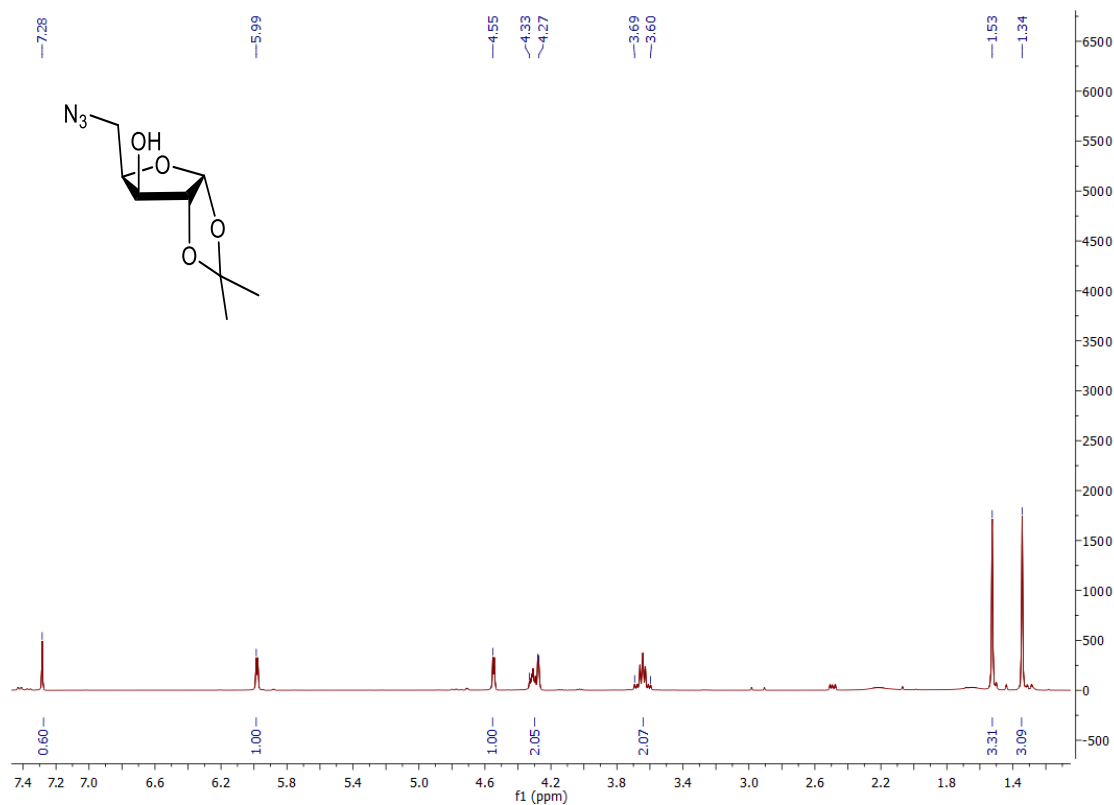


Anexo A 1.11.3. Espetro de HSQC



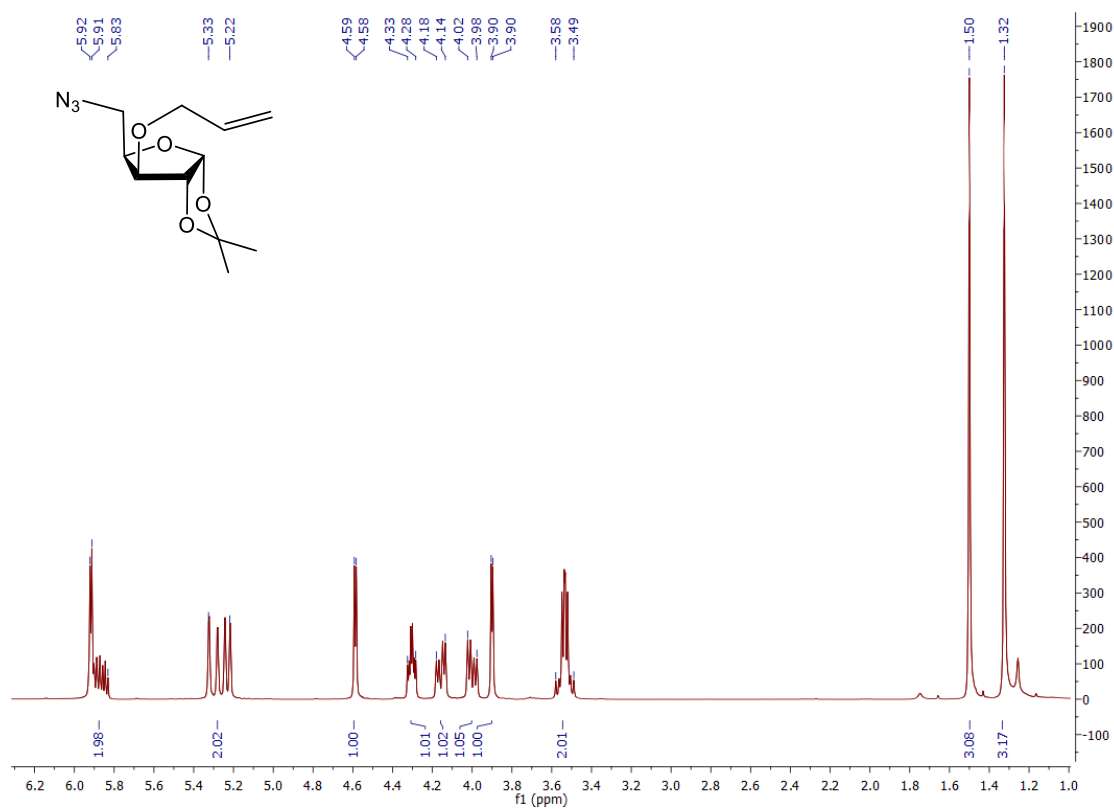
A1.12. Espetros de RMN do composto 23

Anexo A 1.12.1. Espectro de ^1H -RMN

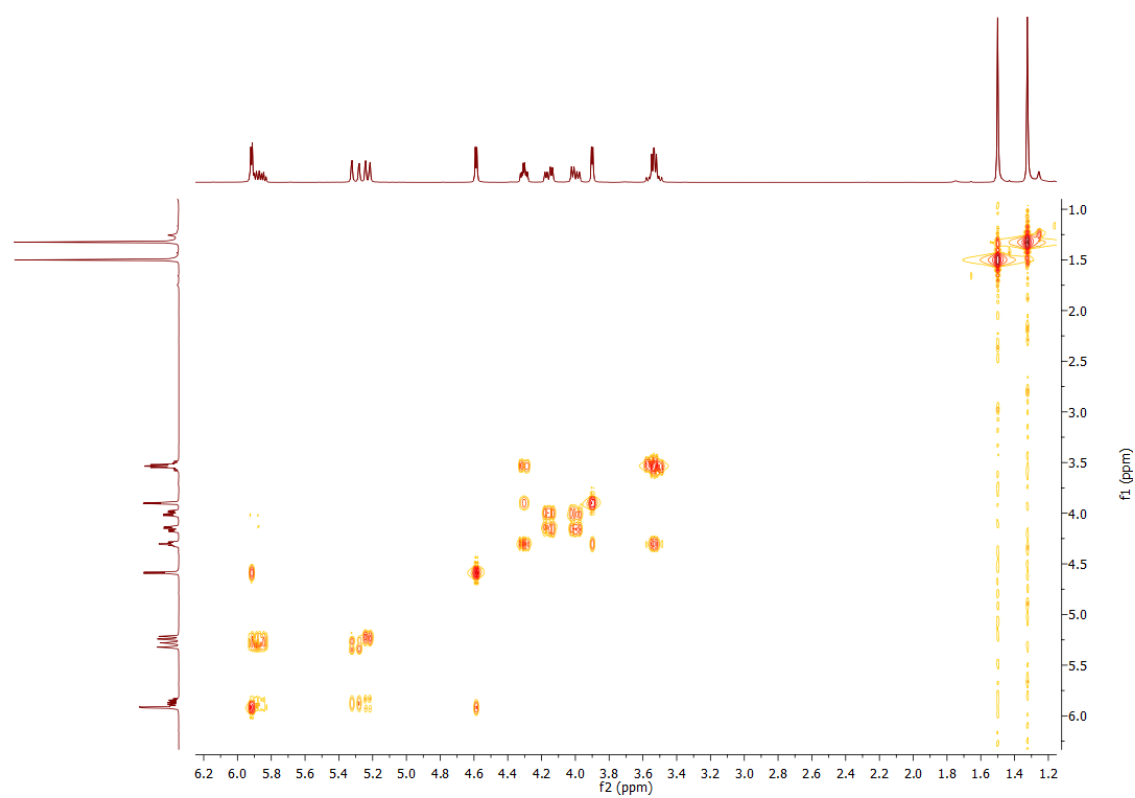


A1.13. Espetros de RMN do composto 24

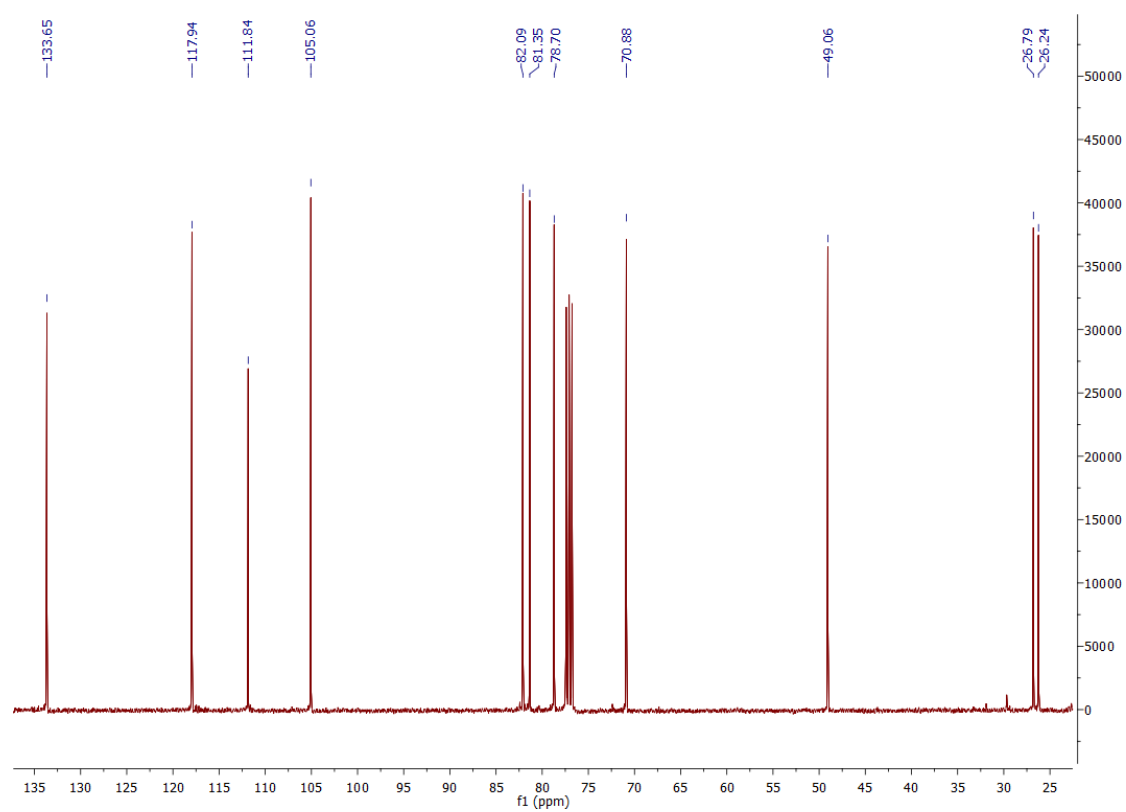
Anexo A 1.13.1. Espectro de ^1H -RMN



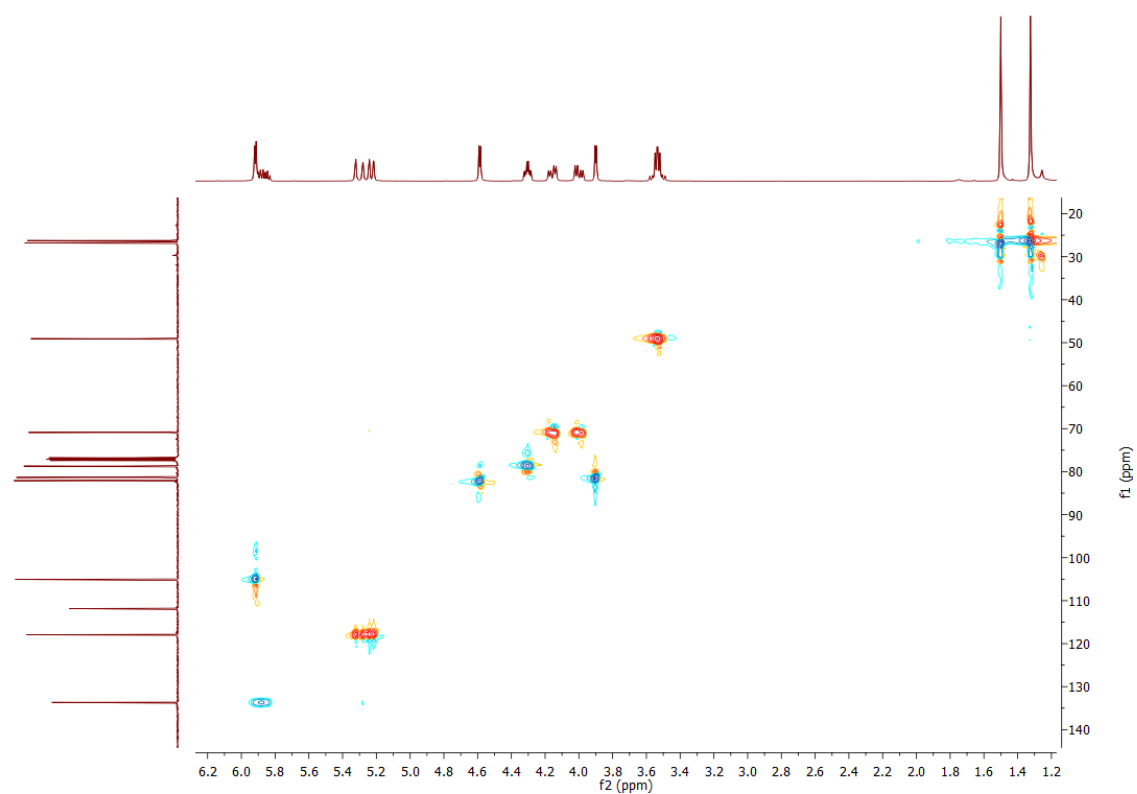
Anexo A 1.13.2. Espectro de COSY



Anexo A 1.13.3. Espectro de ^{13}C -RMN

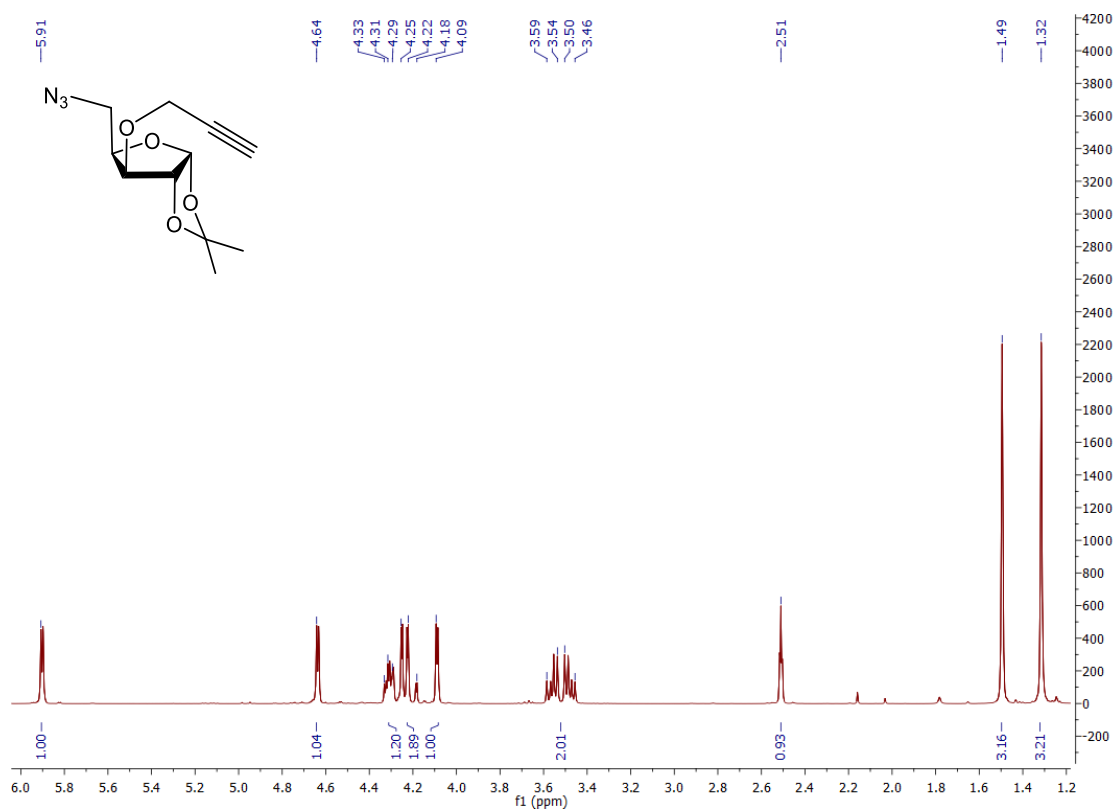


Anexo A 1.13.4. Espectro de HSQC

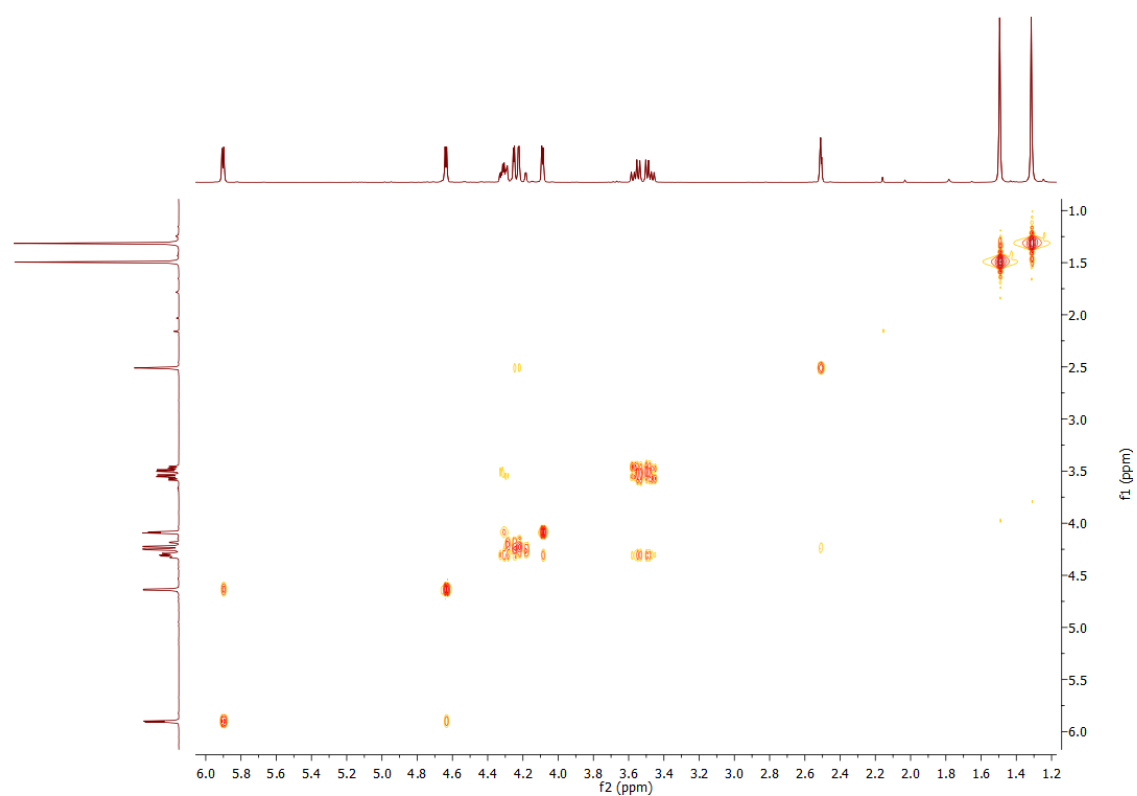


A1.14. Espectros de RMN do composto 25

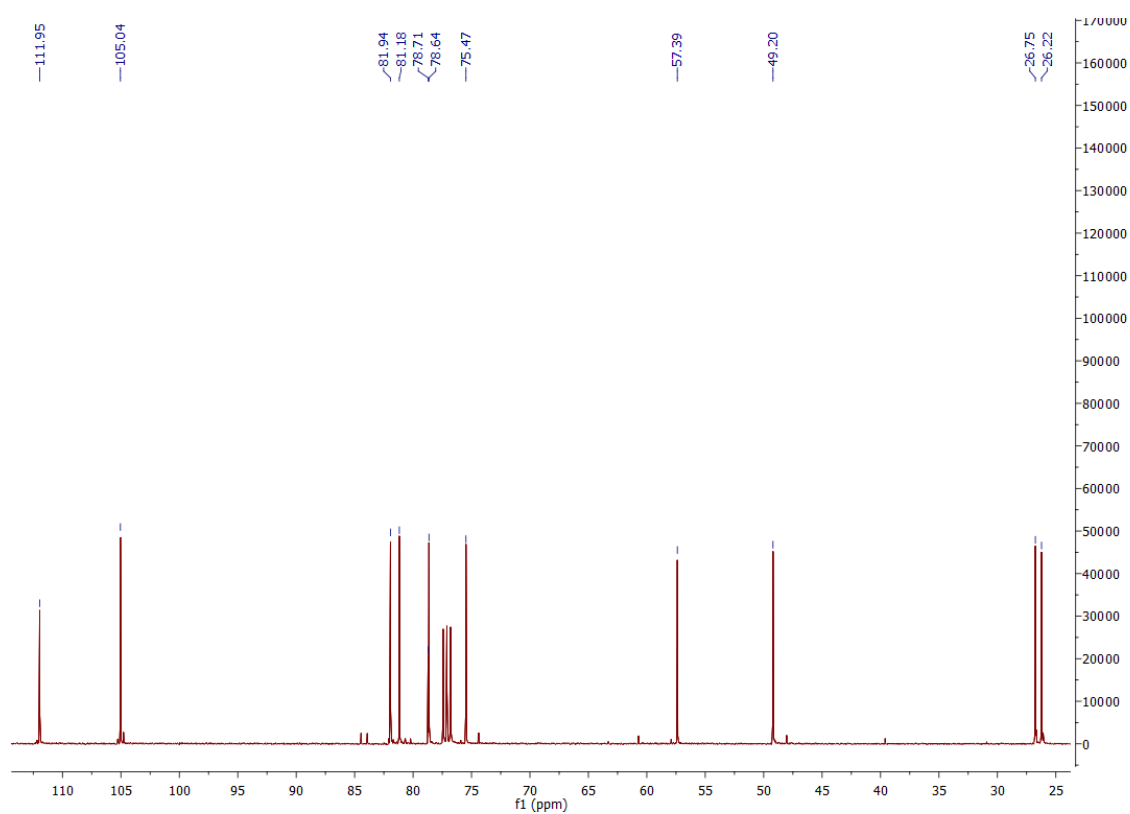
Anexo A 1.14.1. Espectro de ^1H -RMN



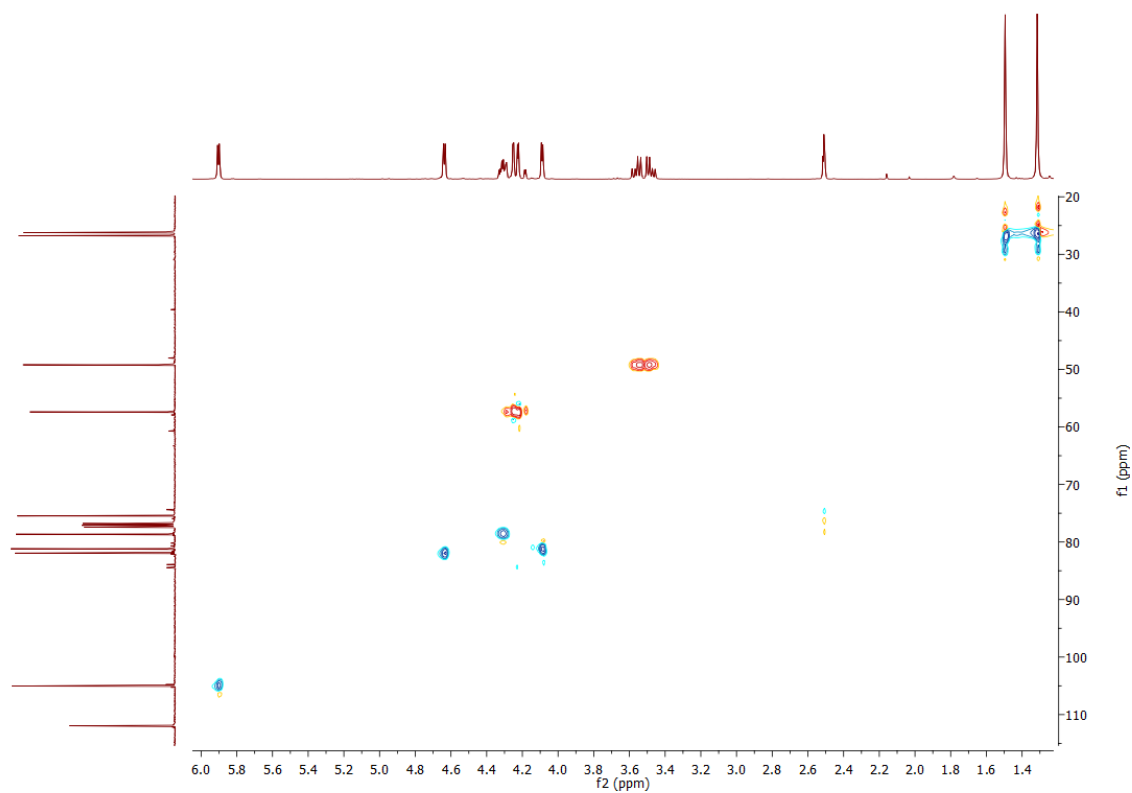
Anexo A 1.14.2. Espectro de COSY



Anexo A 1.14.3. Espectro de ^{13}C -RMN

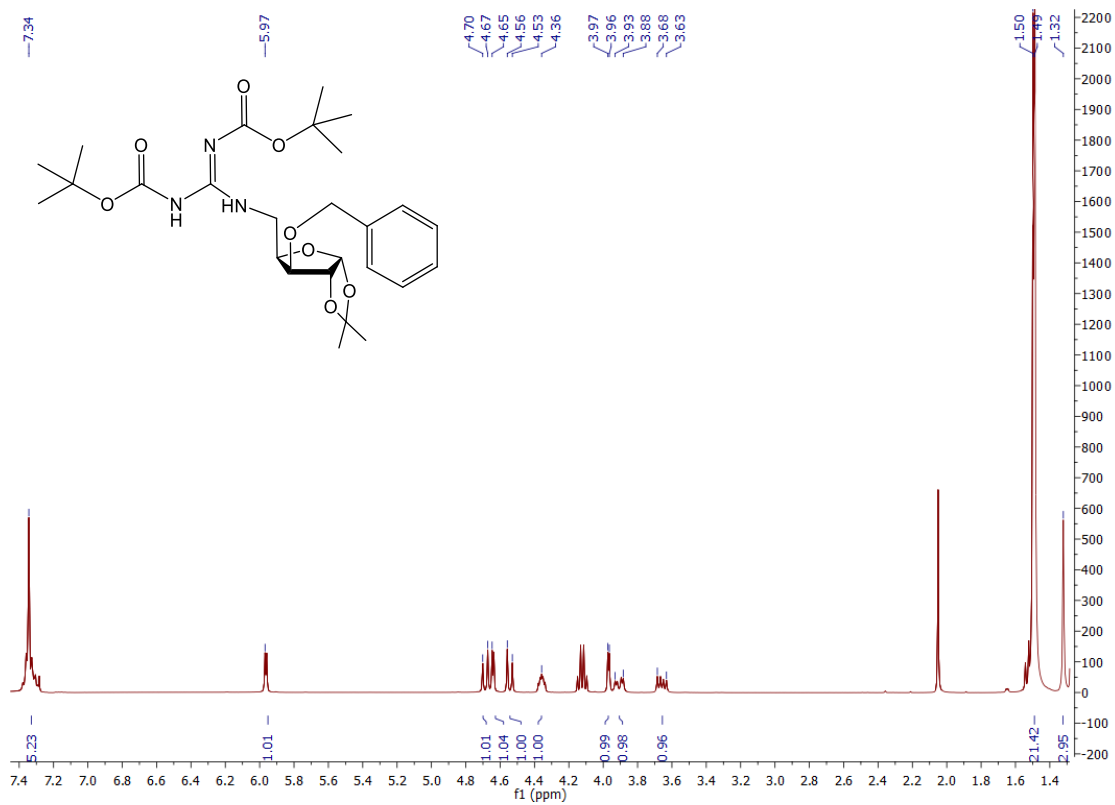


Anexo A 1.14.3. Espectro de HSQC

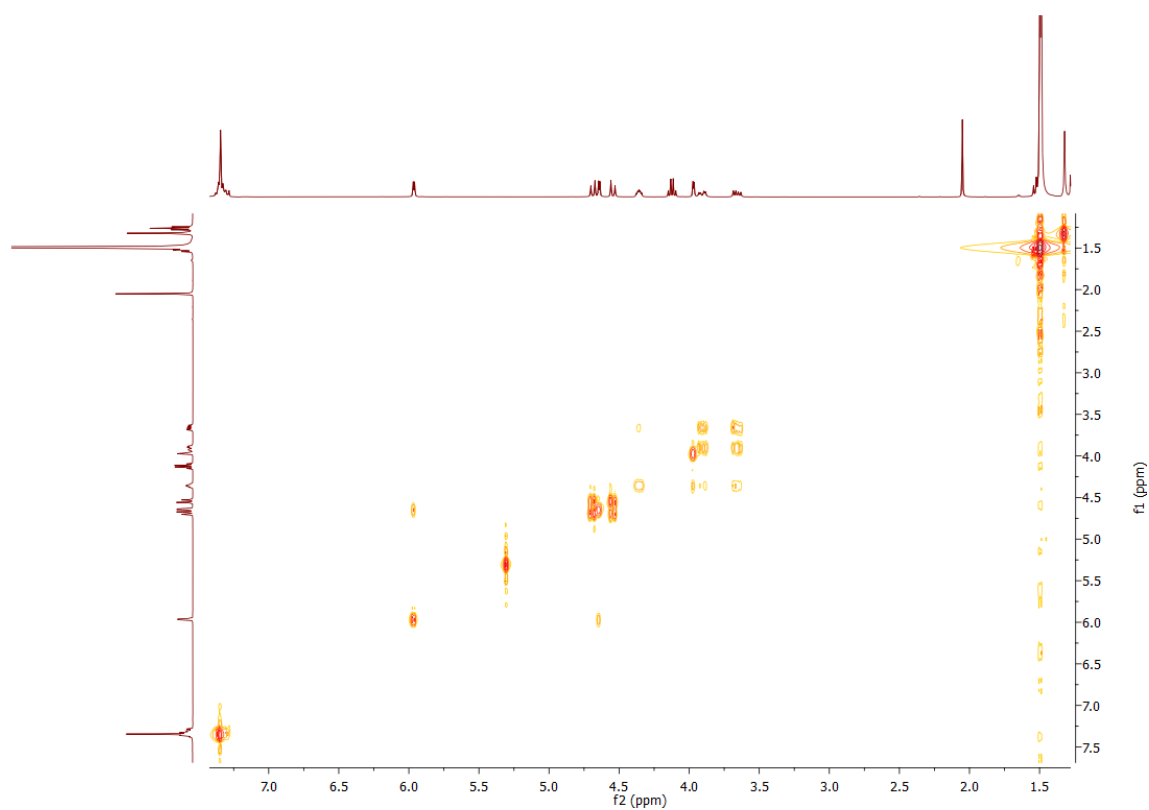


A1.15. Espectros de RMN do composto 26

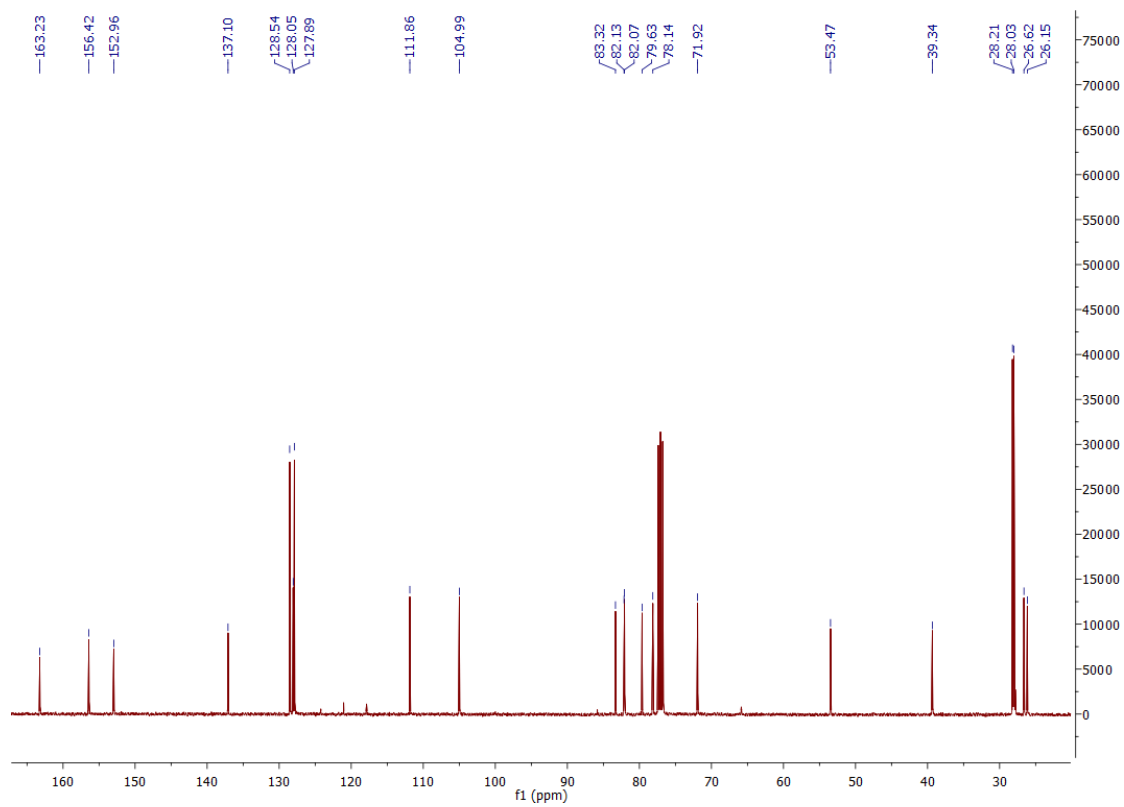
Anexo A 1.15.1. Espectro de ^1H -RMN



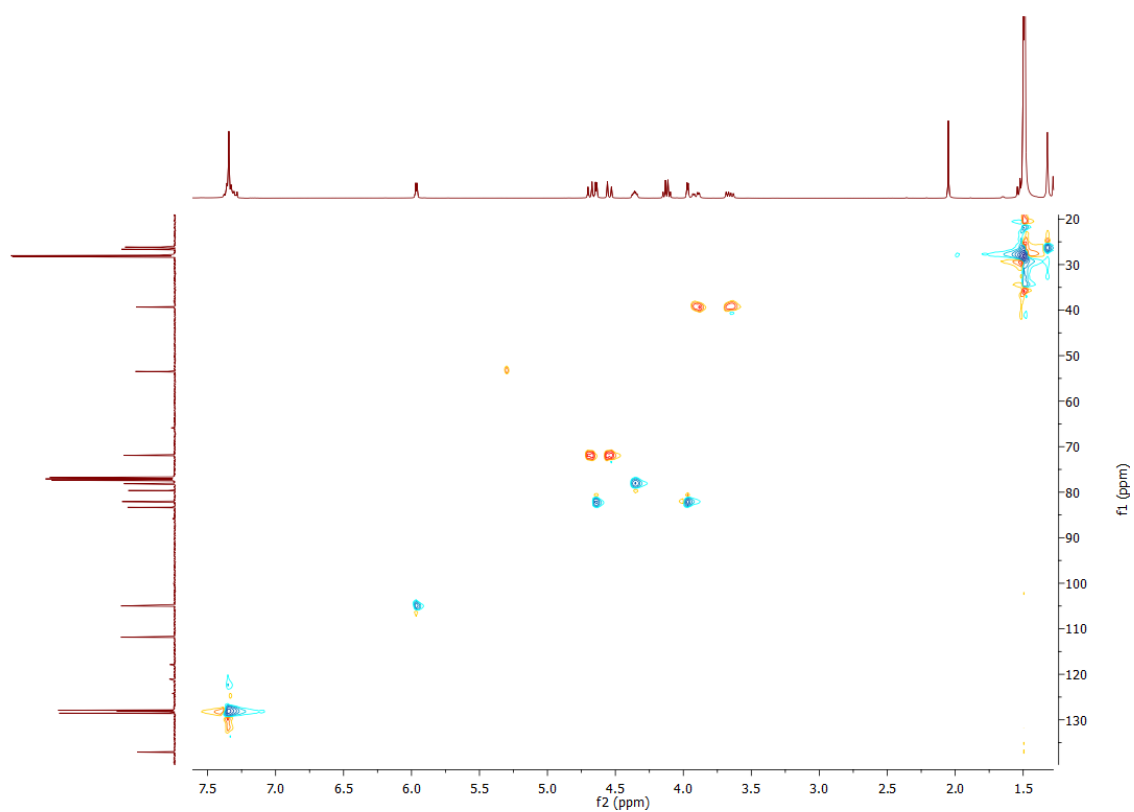
Anexo A 1.15.2. Espectro de COSY



Anexo A 1.15.3. Espectro de ^{13}C -RMN

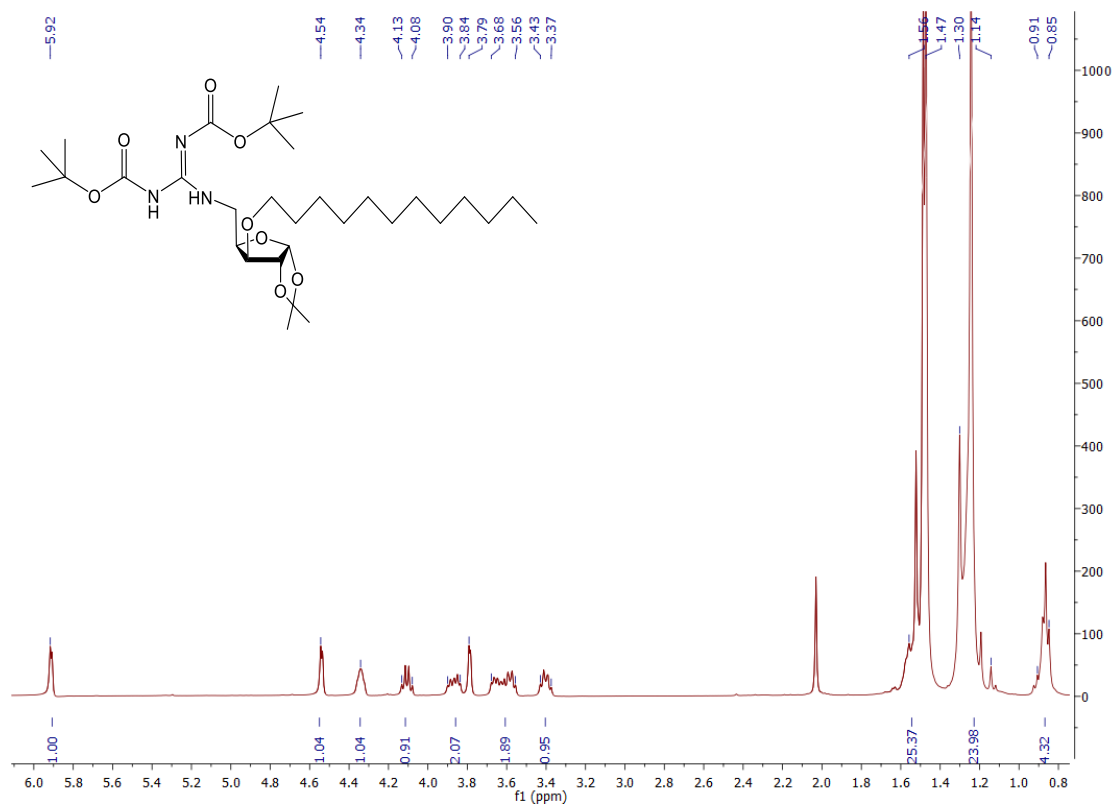


Anexo A 1.15.4. Espectro de HSQC

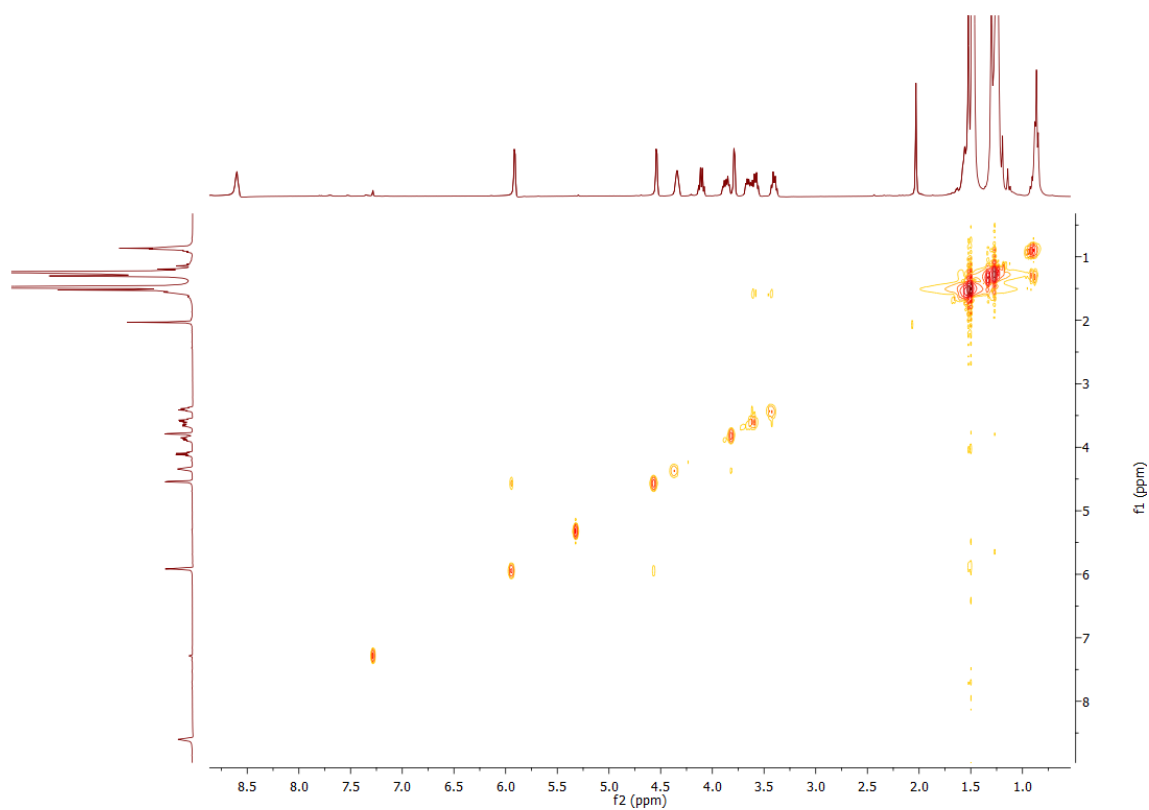


A1.16. Espectros de RMN do composto 27

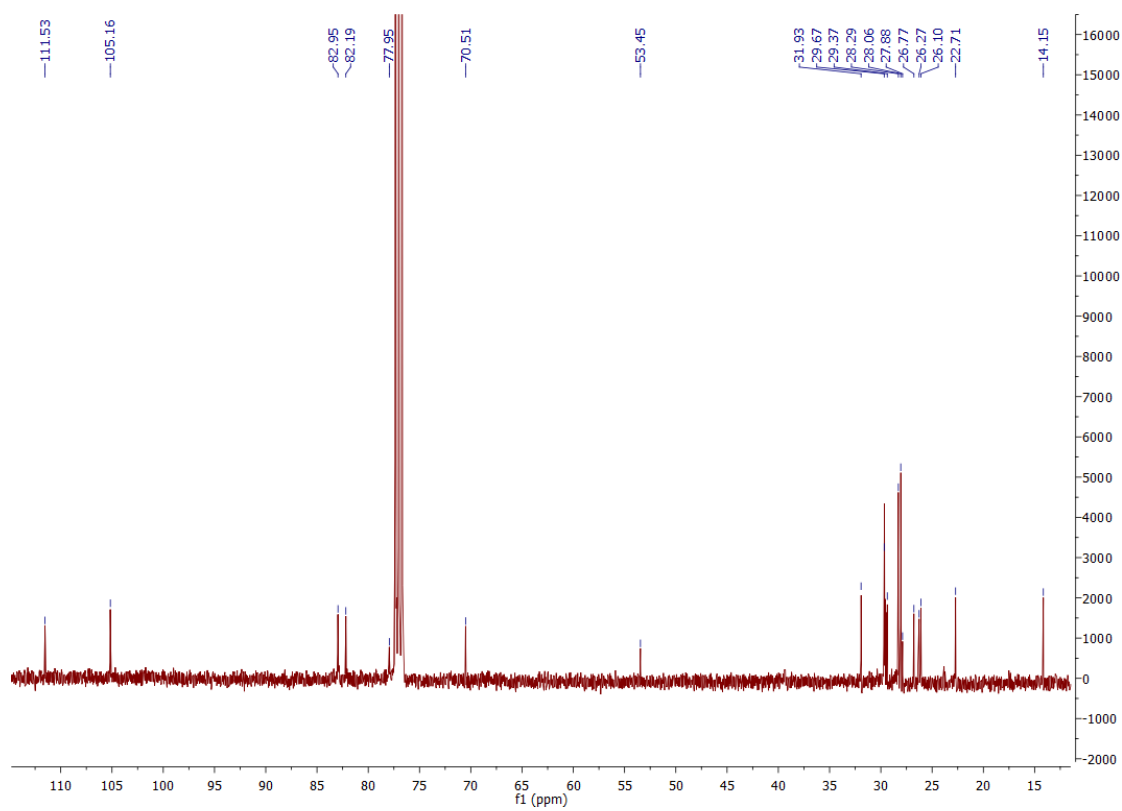
Anexo A 1.16.1. Espectro de ^1H -RMN



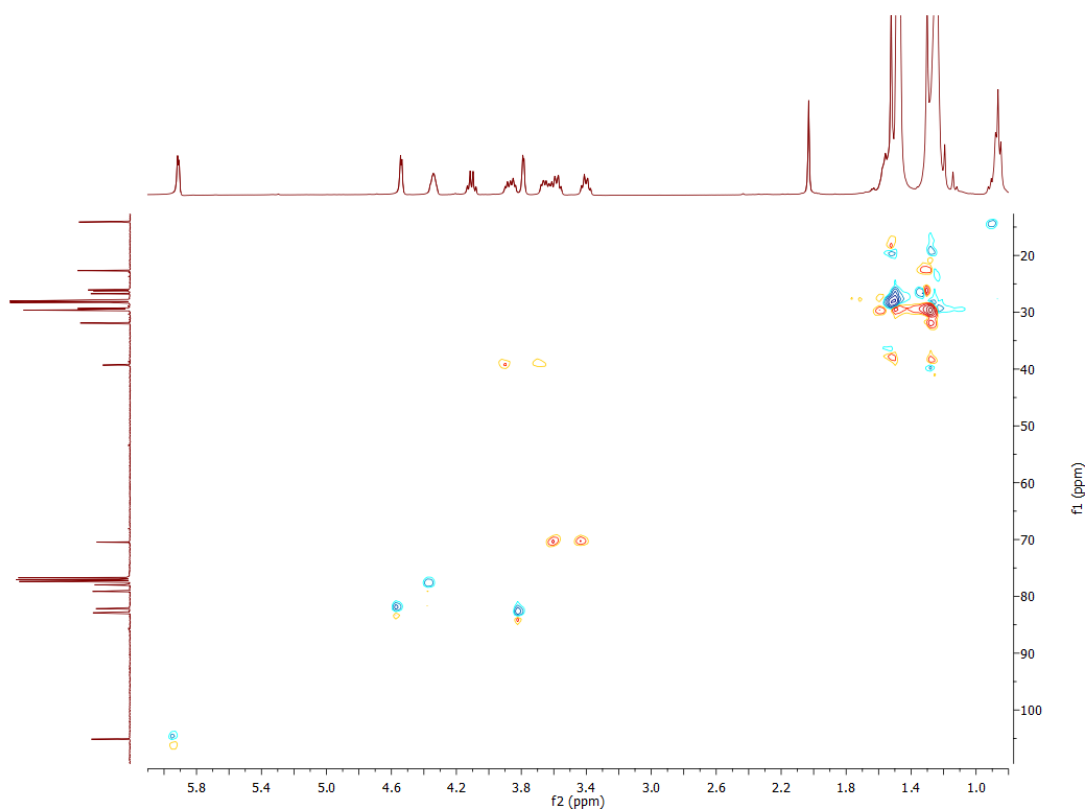
Anexo A 1.16.2. Espectro de COSY



Anexo A 1.16.3. Espectro de ^{13}C -RMN

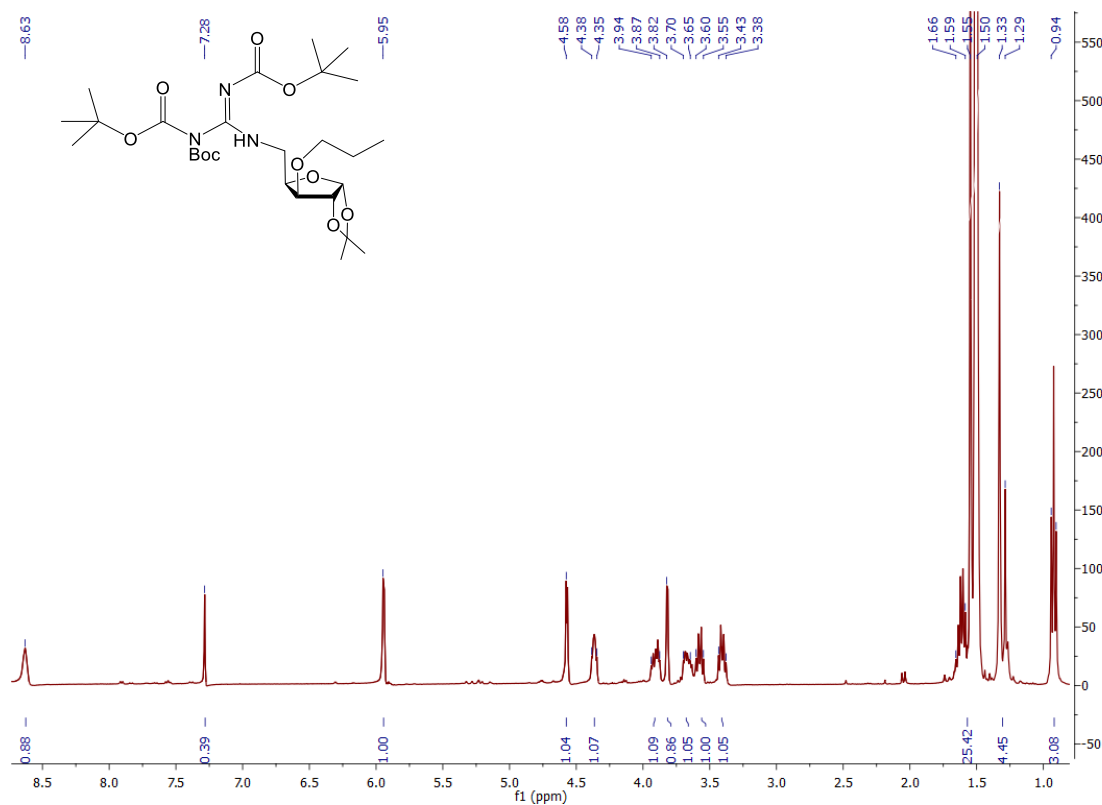


Anexo A 1.16.4. Espectro de HSQC

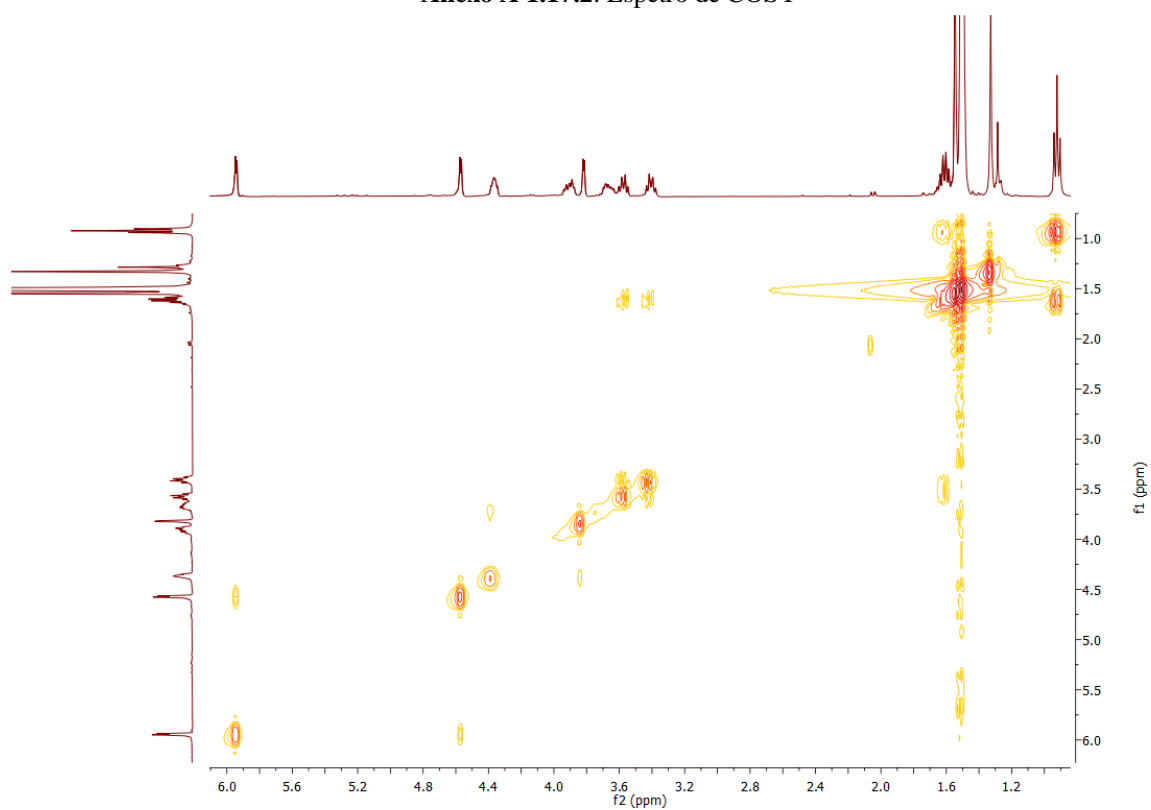


A1.17. Espectros de RMN do composto 28

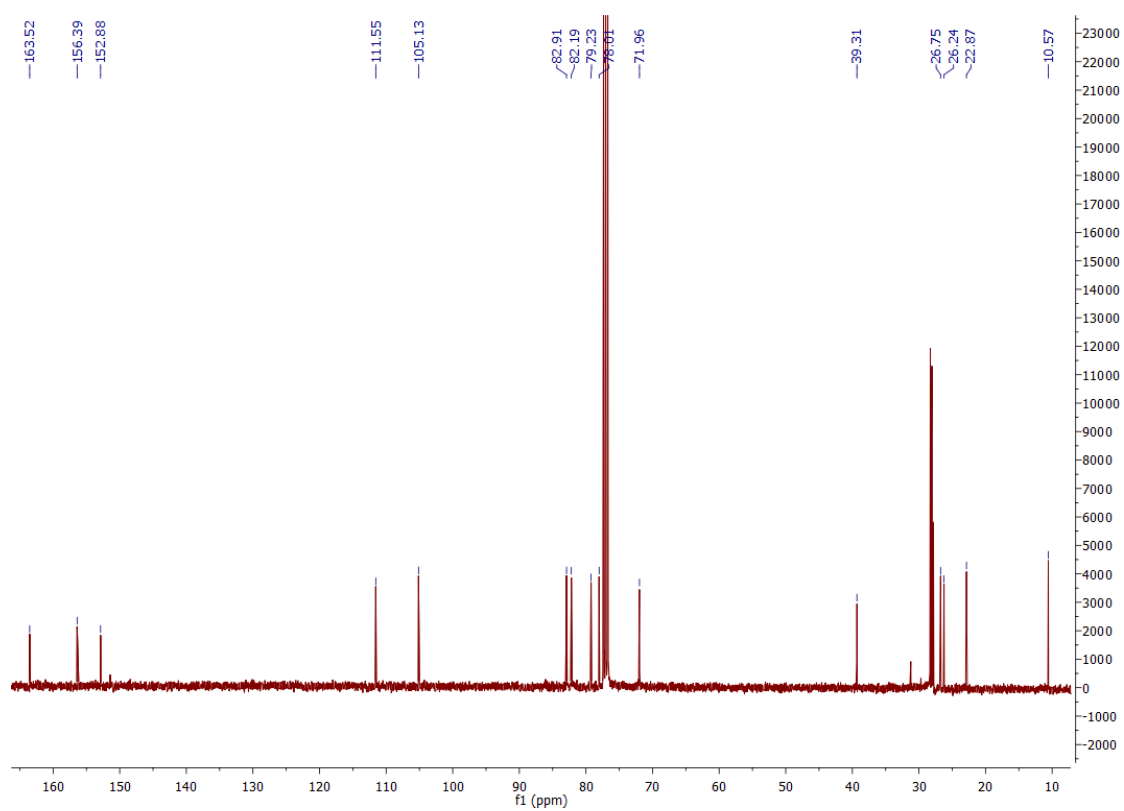
Anexo A 1.17.1. Espectro de ^1H -RMN



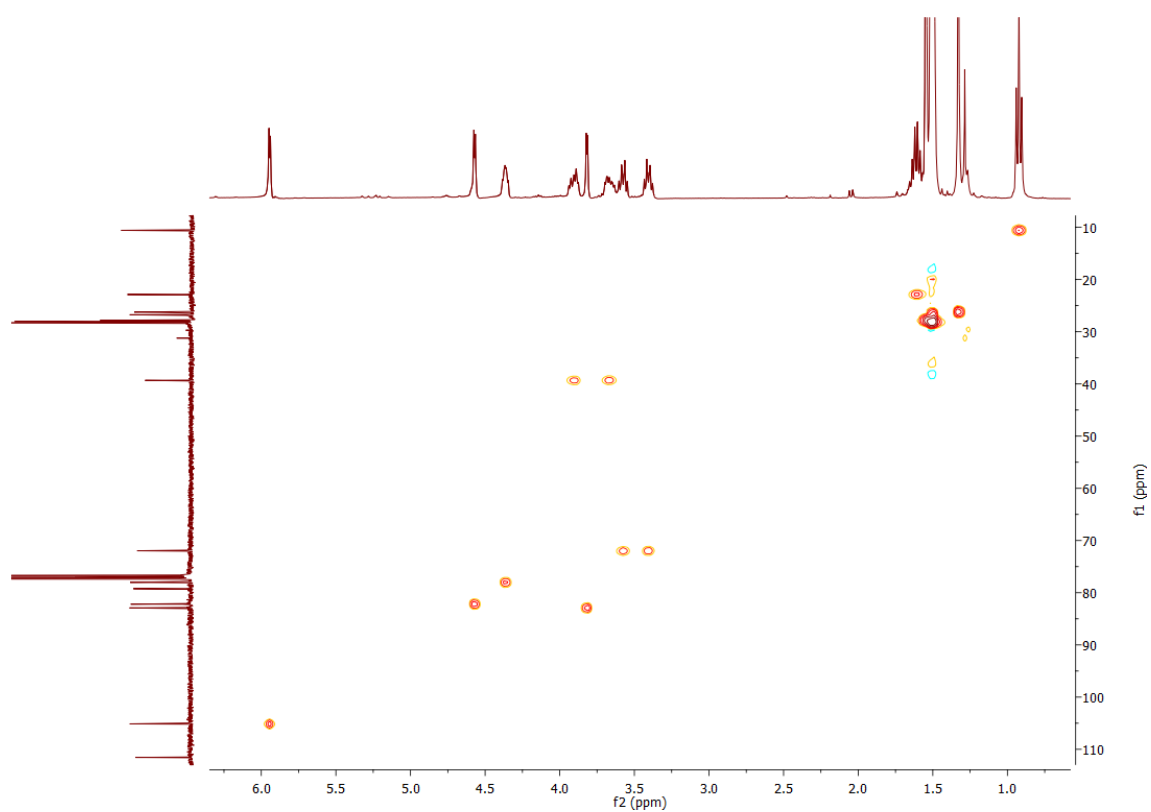
Anexo A 1.17.2. Espectro de COSY



Anexo A 1.17.3. Espectro de ^{13}C -RMN

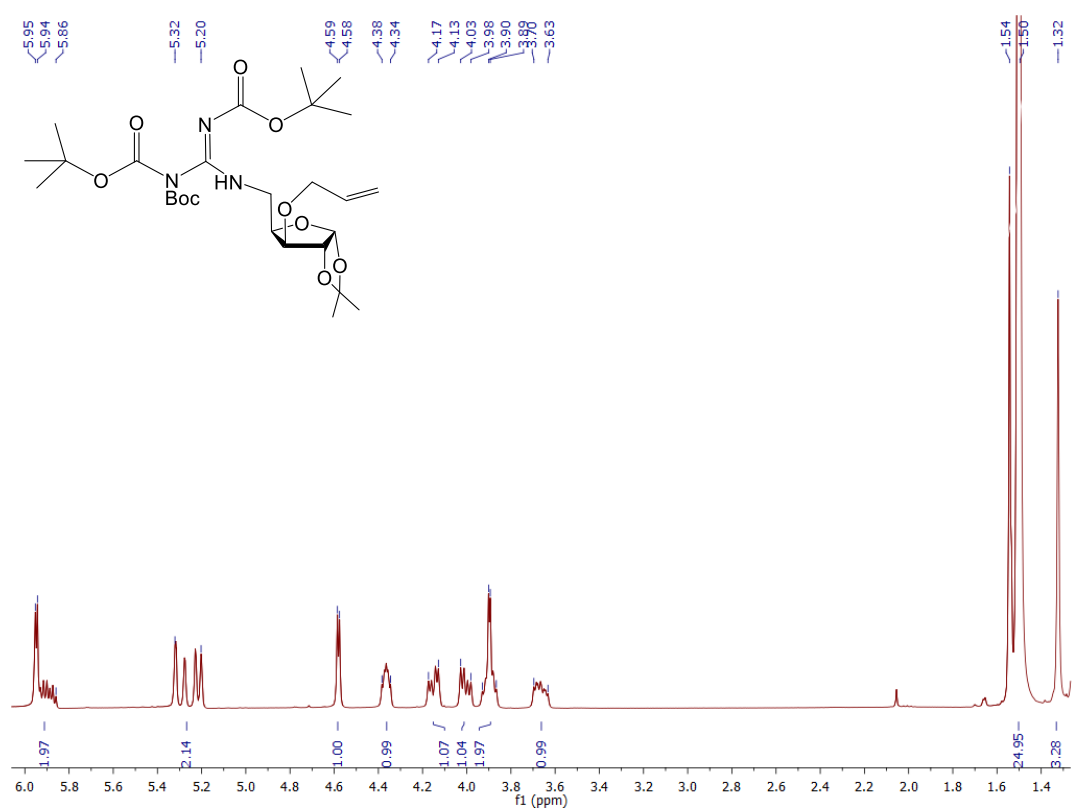


Anexo A 1.17.4. Espectro de HSQC

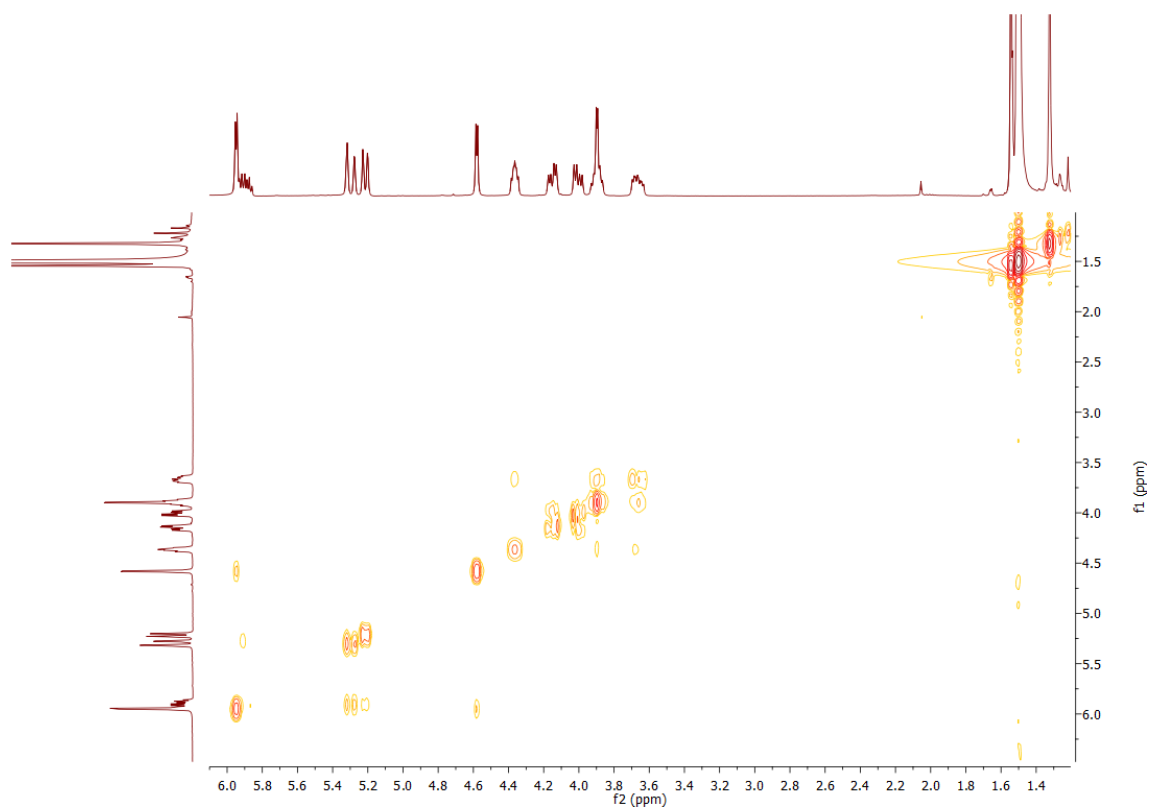


A1.18. Espectros de RMN do composto 29

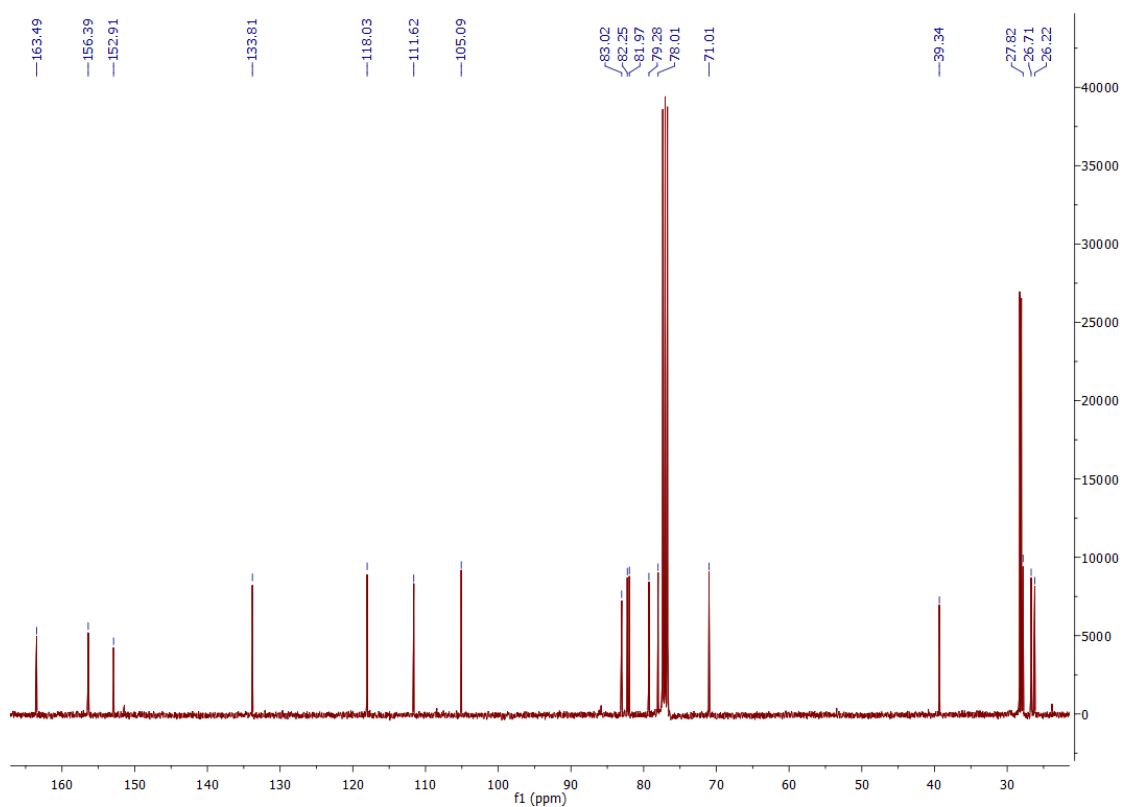
Anexo A 1.18.1. Espectro de ^1H -RMN



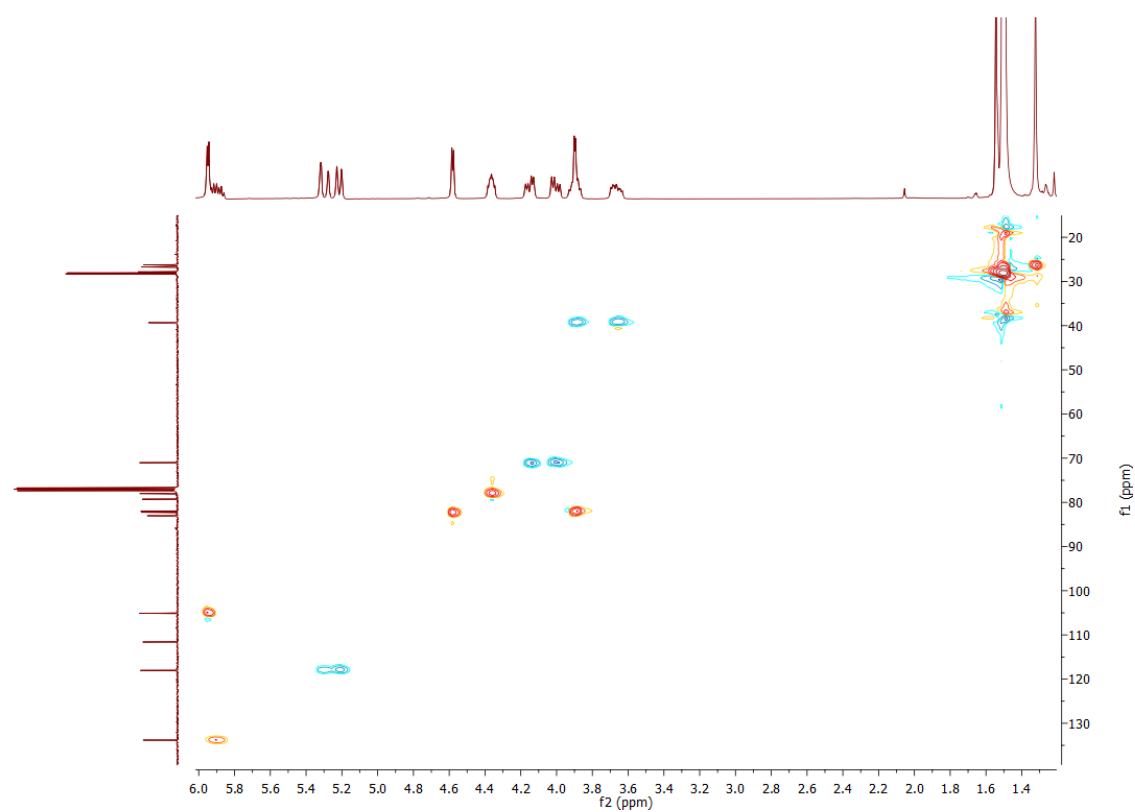
Anexo A 1.18.2. Espectro de COSY



Anexo A 1.18.3. Espectro de ^{13}C -RMN

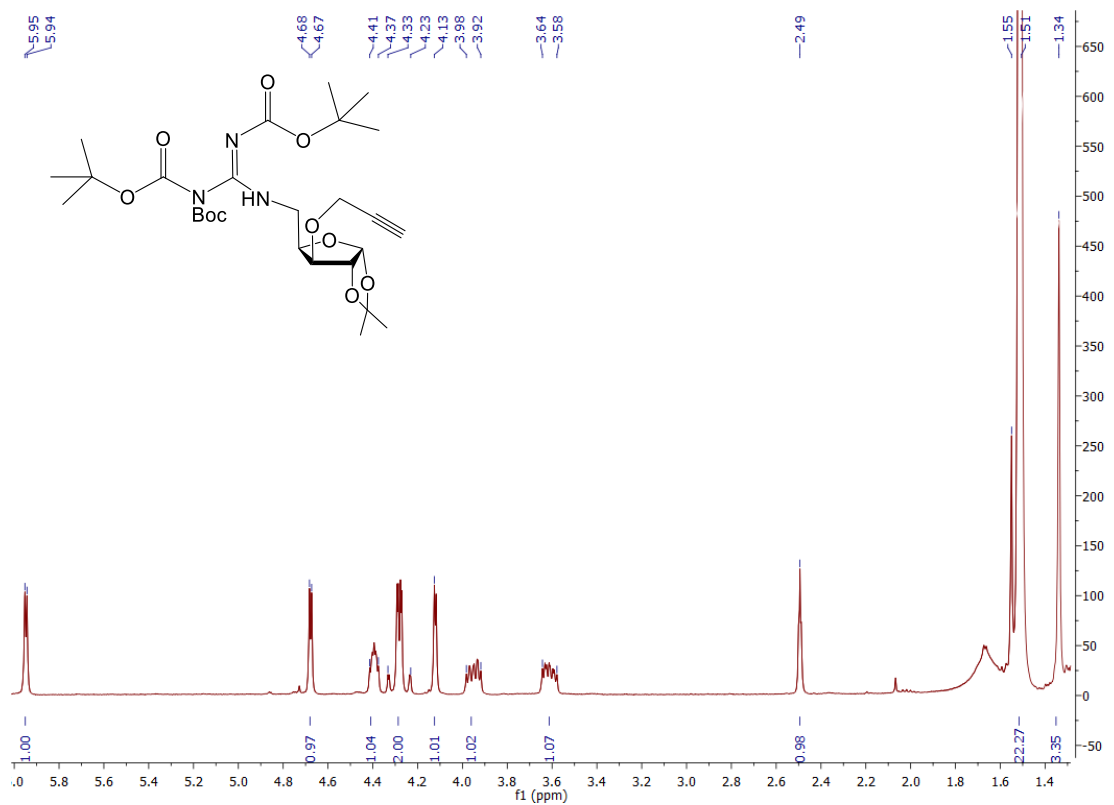


Anexo A 1.18.4. Espectro de HSQC

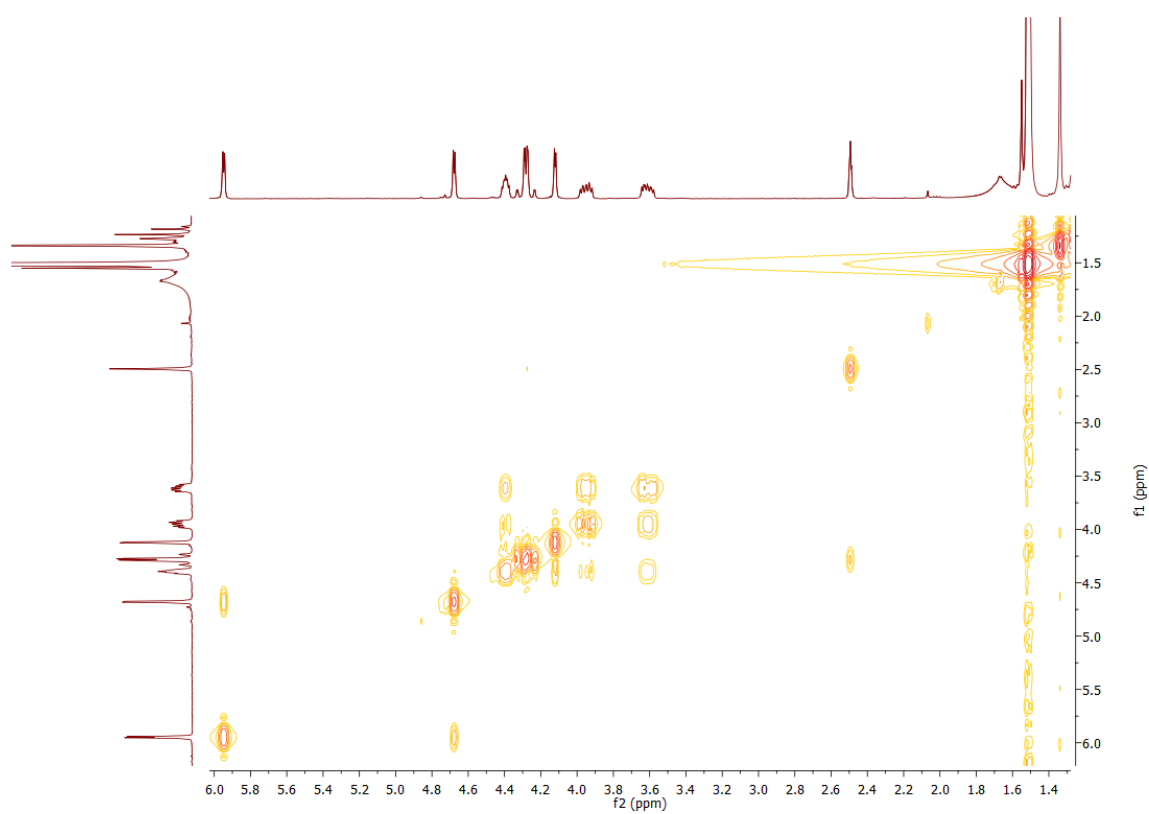


A1.19. Espectros de RMN do composto 30

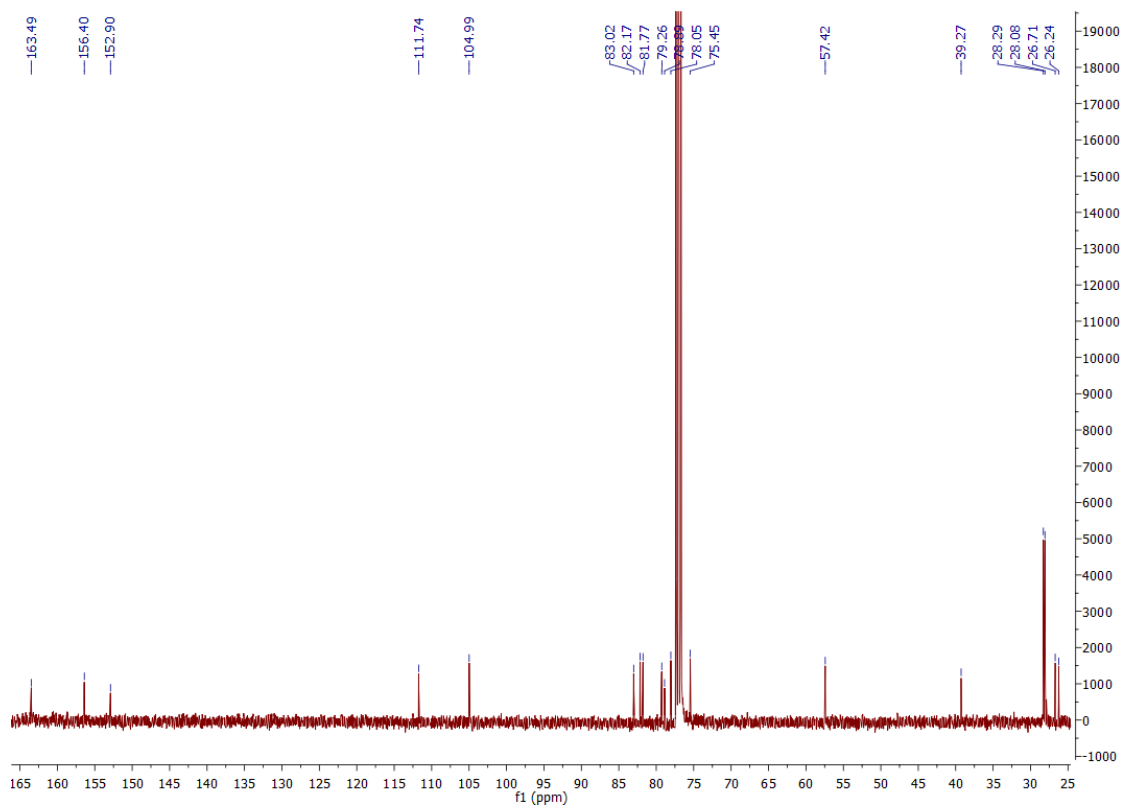
Anexo A 1.19.1. Espectro de ^1H -RMN



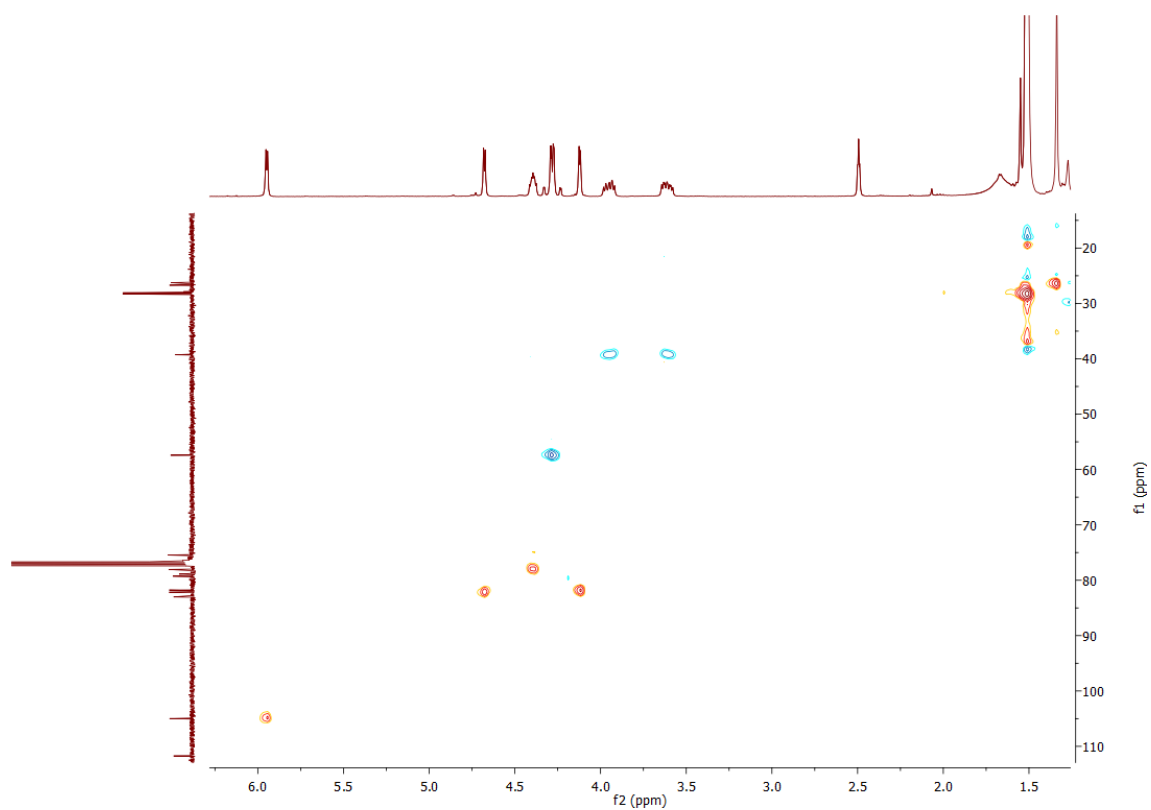
Anexo A 1.19.2. Espectro de COSY



Anexo A 1.19.3. Espectro de ^{13}C -RMN

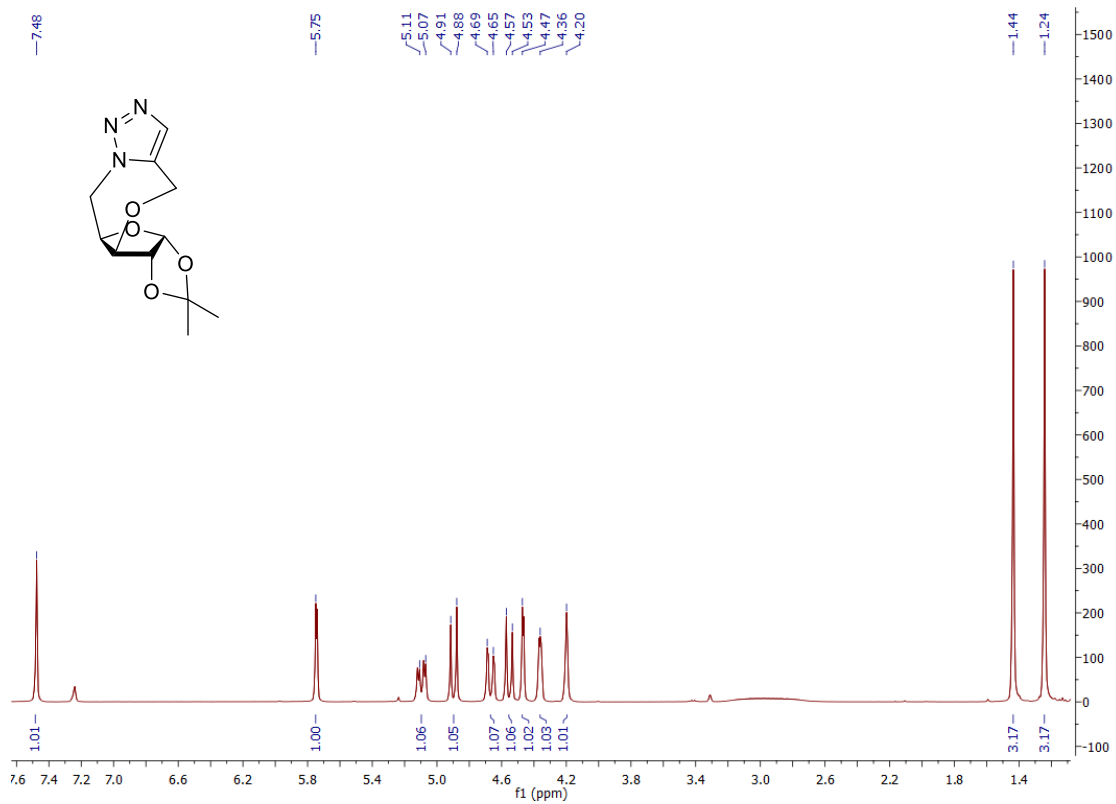


Anexo A 1.19.4. Espetro de HSQC

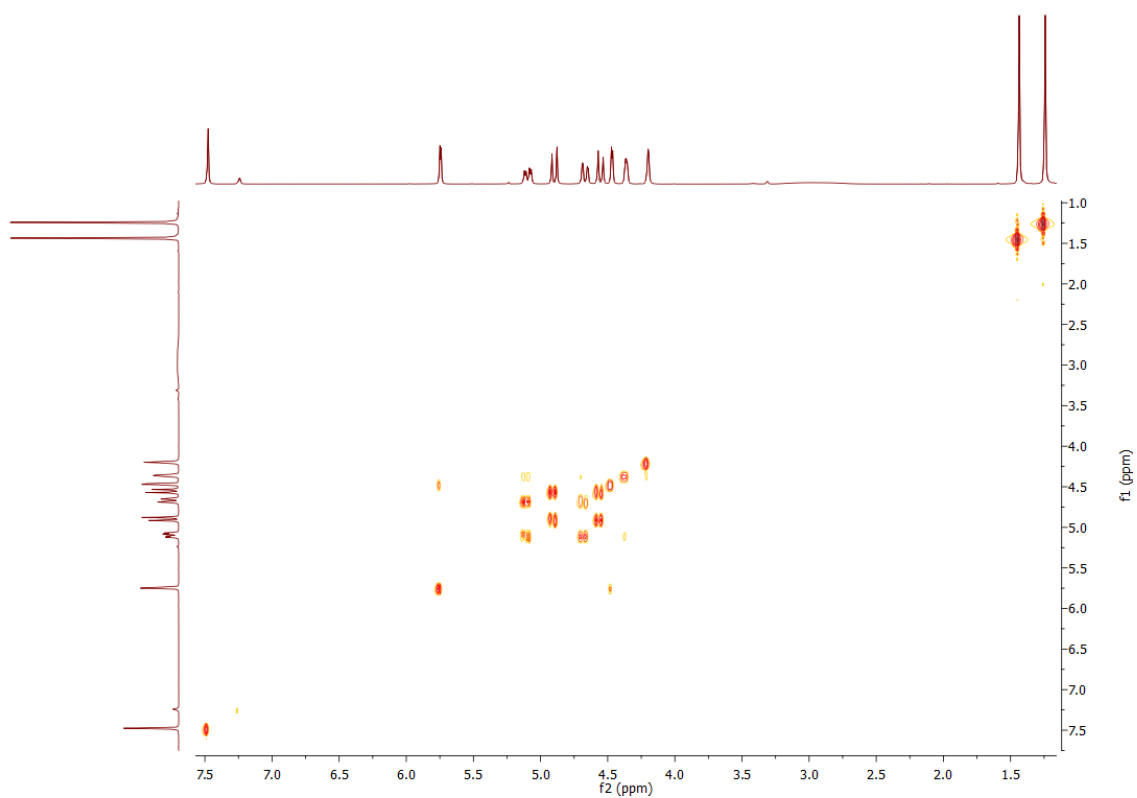


A1.20. Espetros de RMN do composto 31

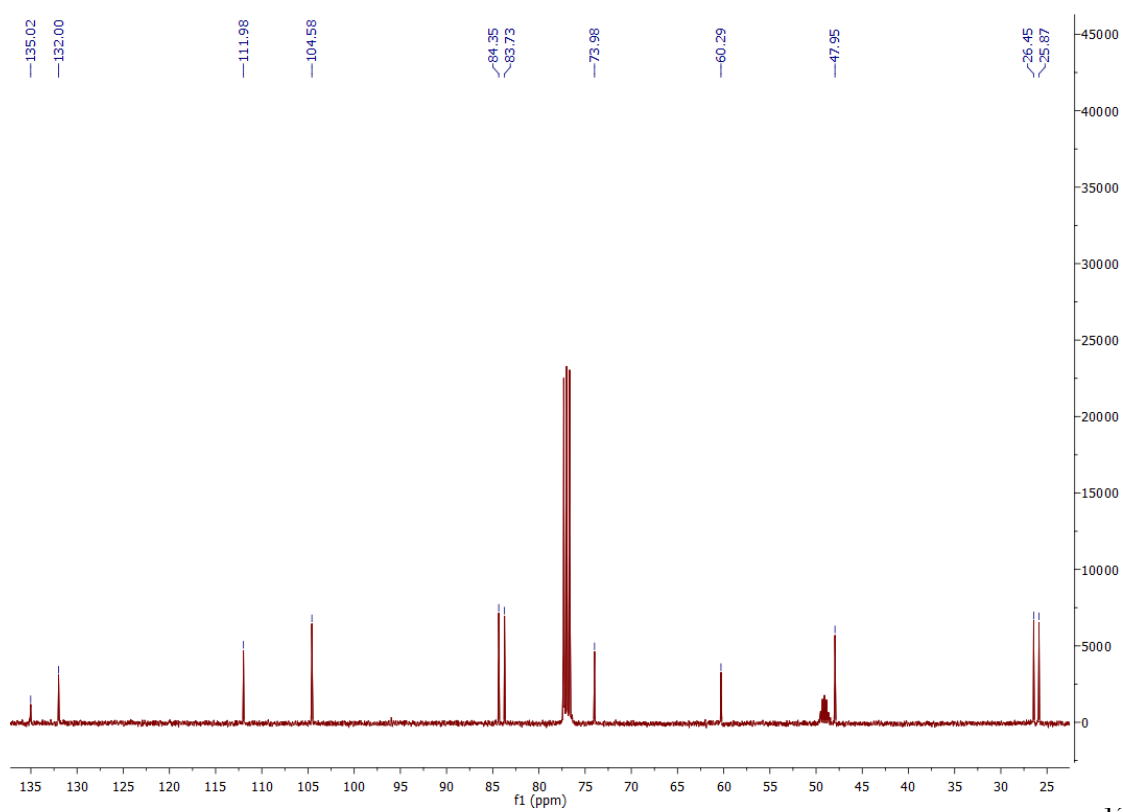
Anexo A 1.20.1. Espetro de ^1H -RMN



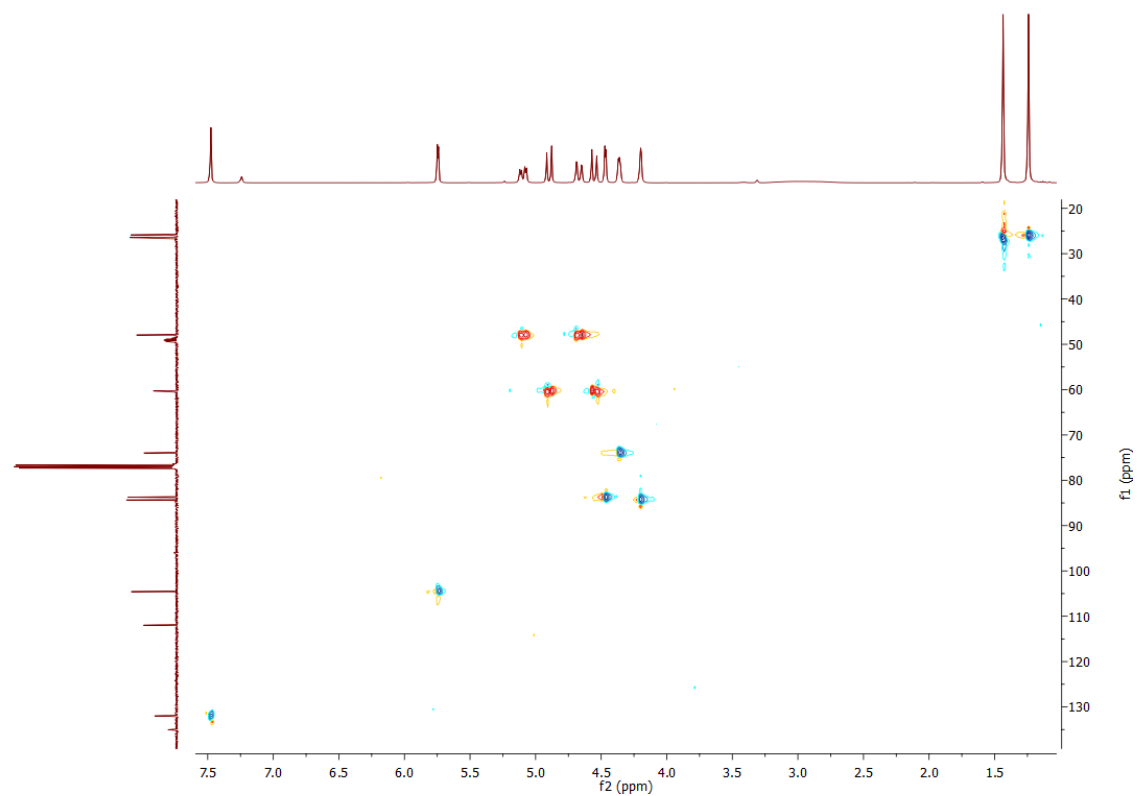
Anexo A 1.20.2. Espectro de COSY



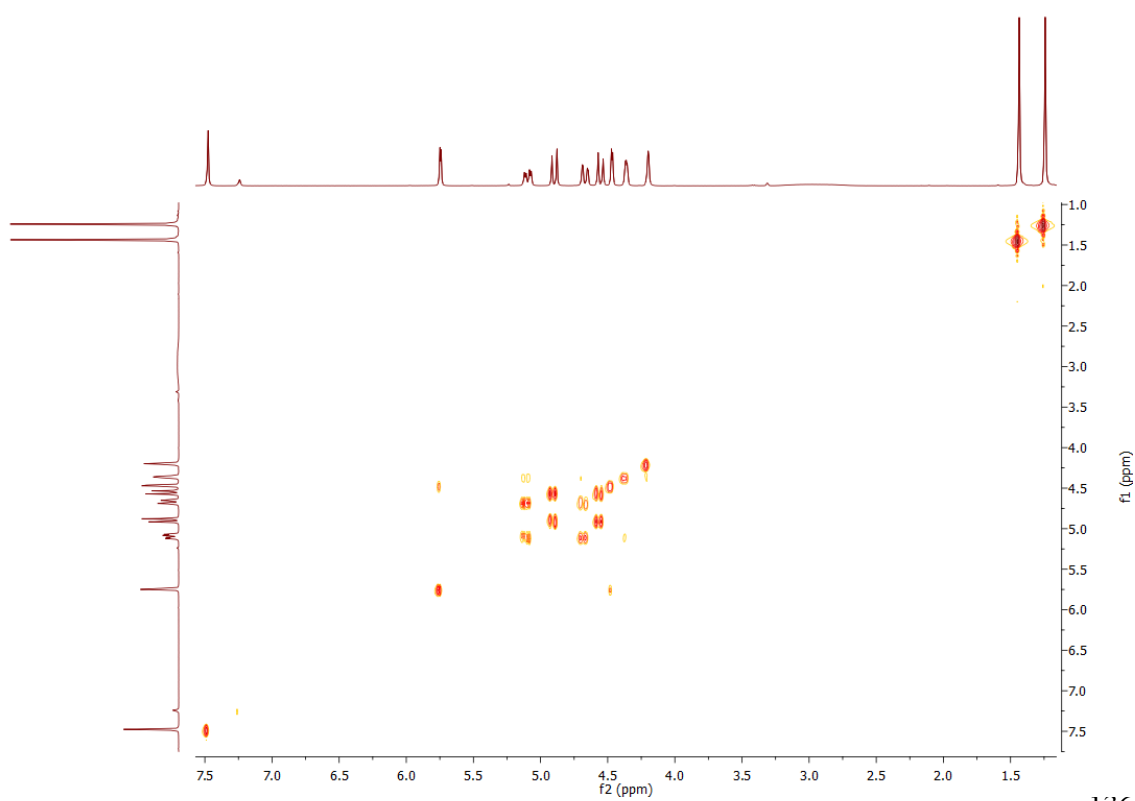
Anexo A 1.20.3. Espectro de ^{13}C -RMN



Anexo A 1.20.4. Espectro de HSQC

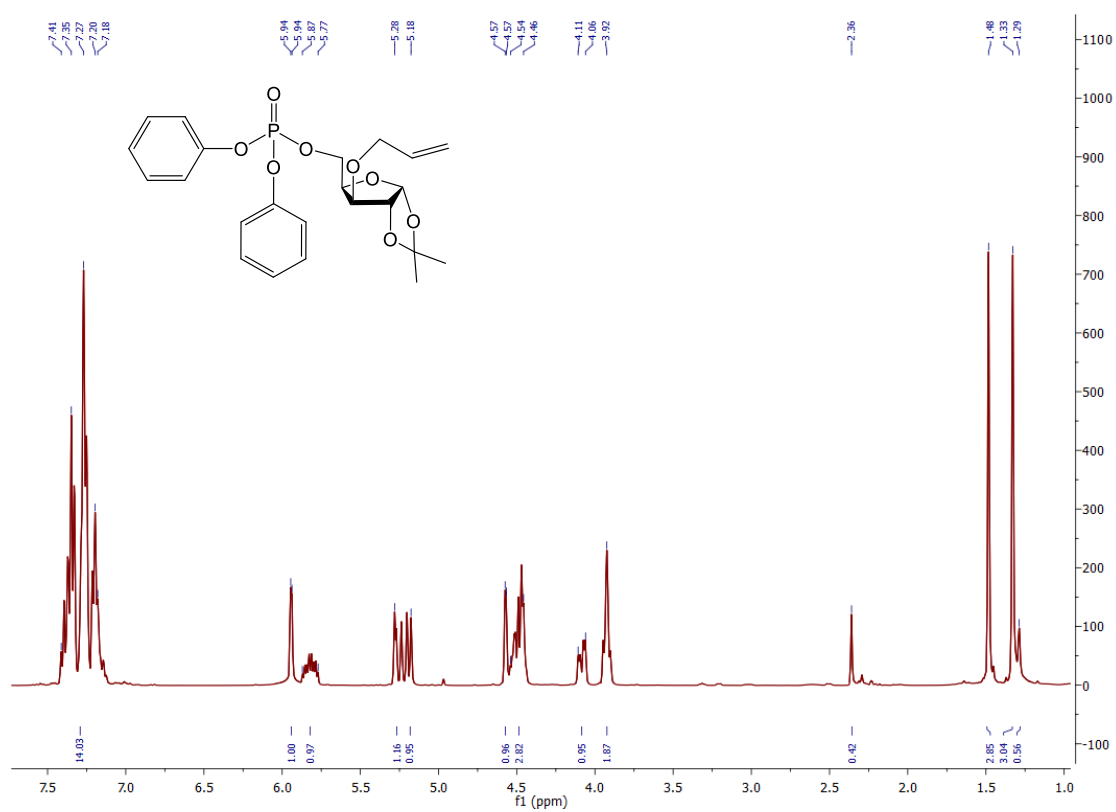


Anexo A 1.20.5. Espectro de HMBC

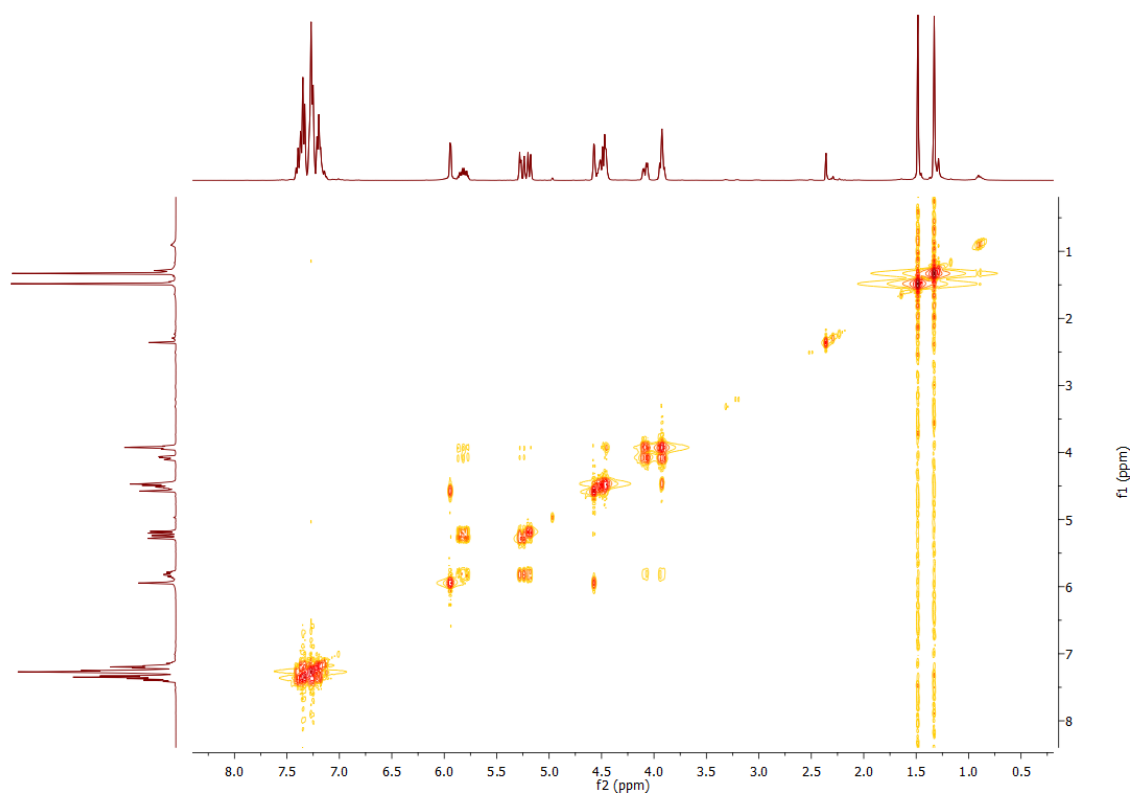


A1.21. Espectros de RMN do composto 32

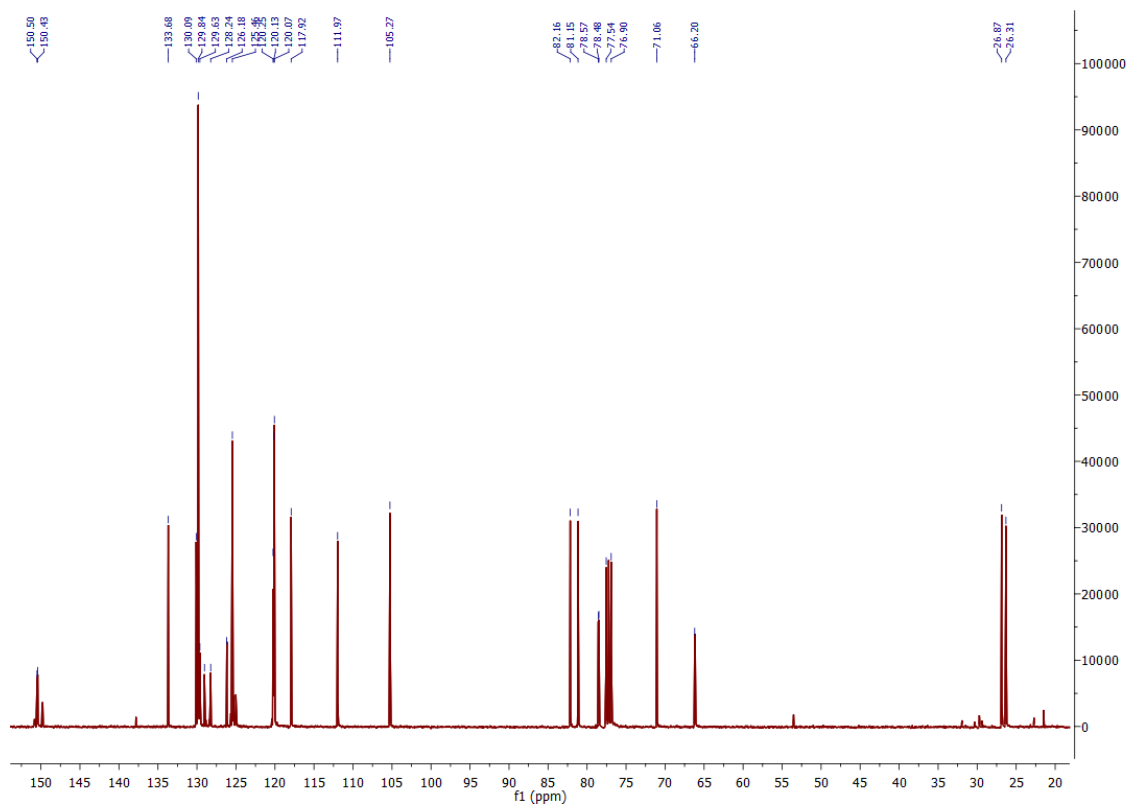
Anexo A 1.21.1. Espectro de ^1H -RMN



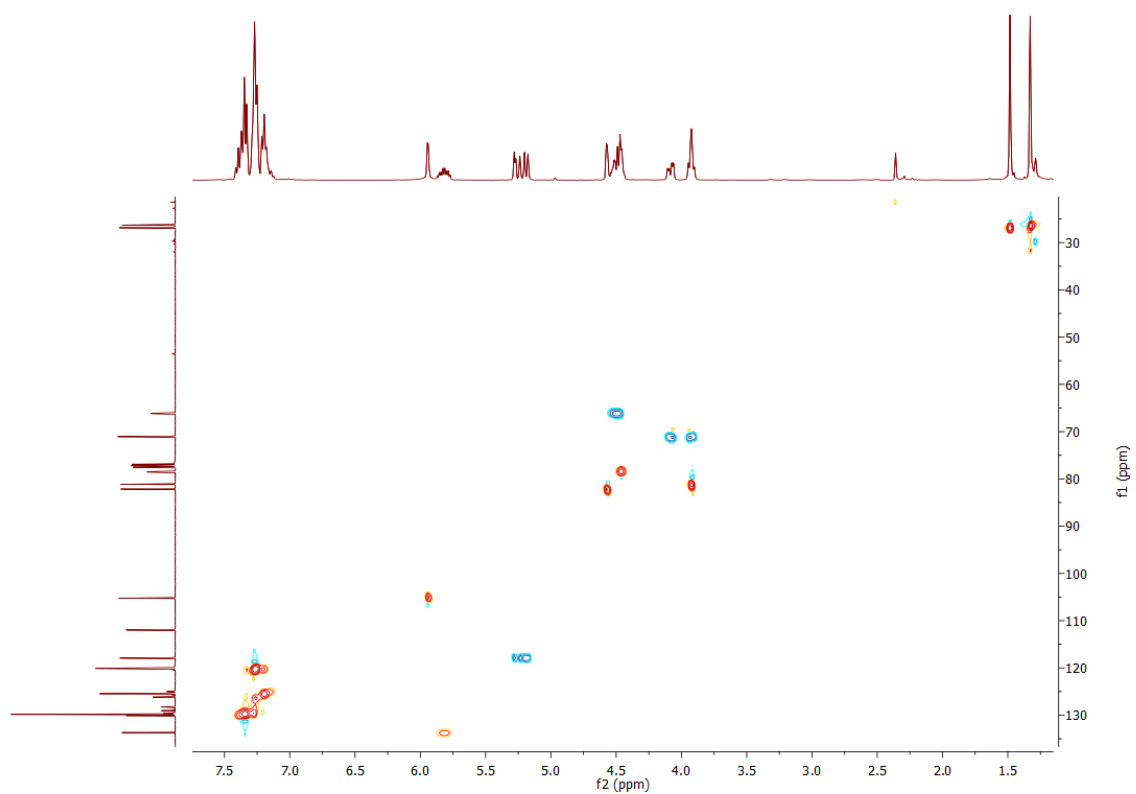
Anexo A 1.21.2. Espectro de COSY



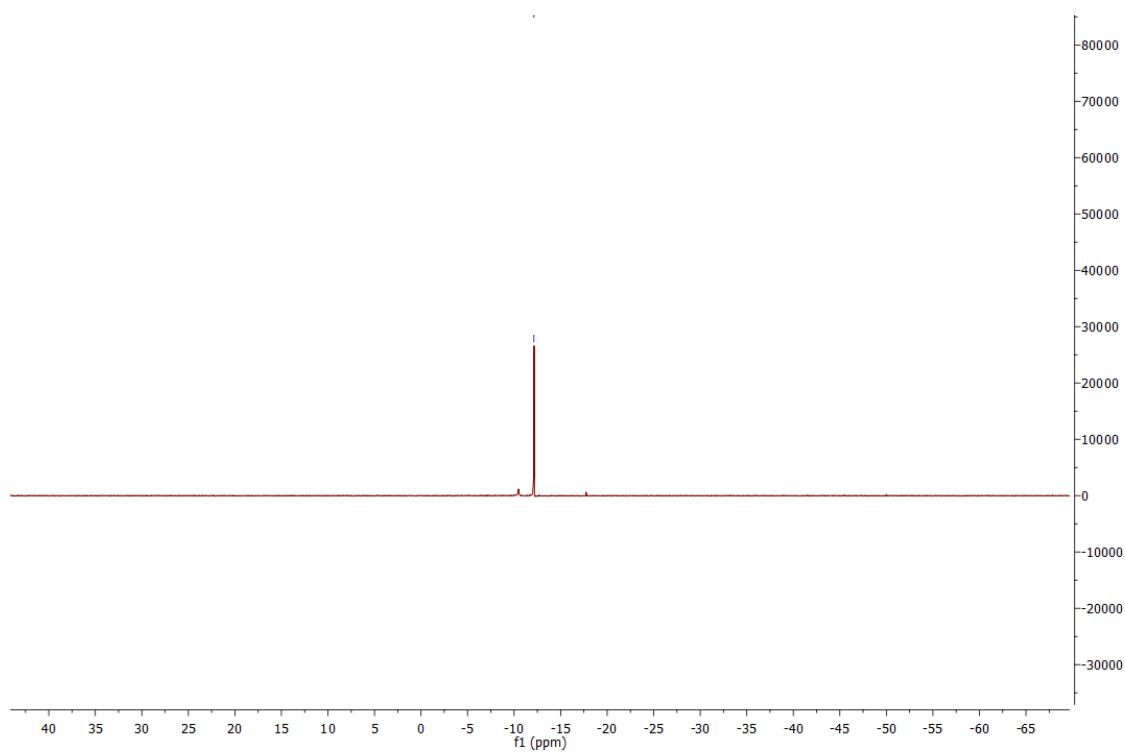
Anexo A 1.21.3. Espectro de ^{13}C -RMN



Anexo A 1.21.4. Espectro de HSQC

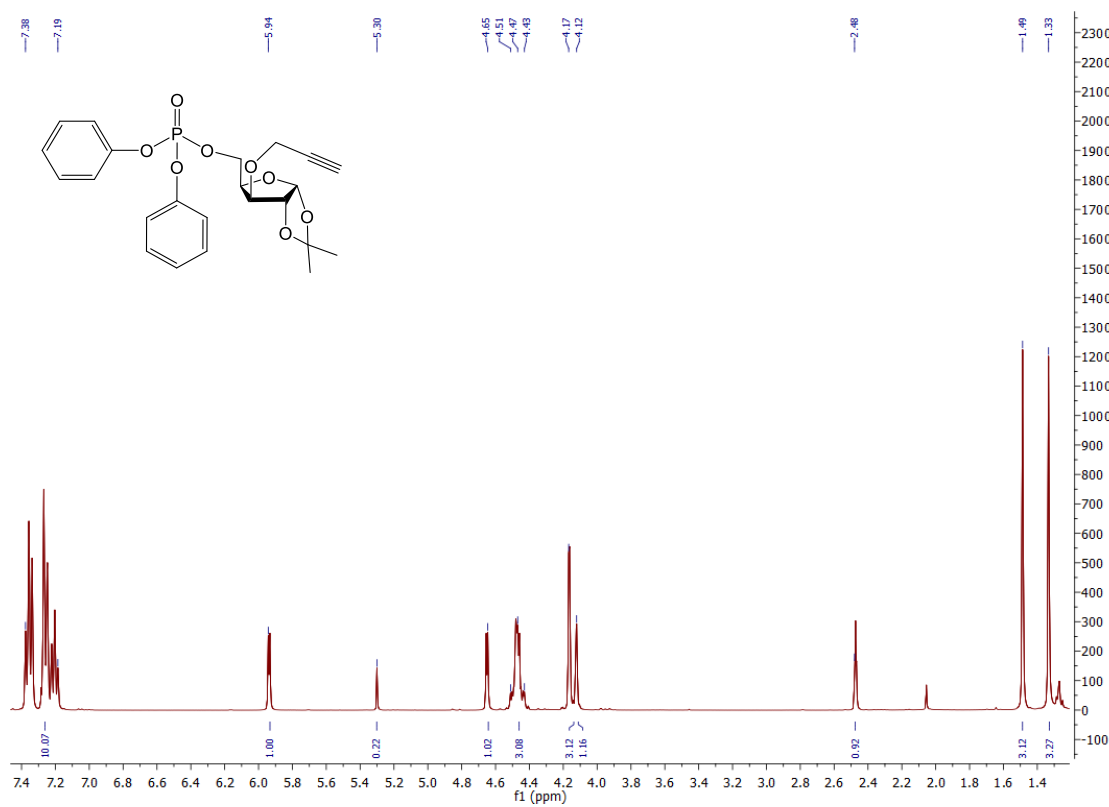


Anexo A 1.21.5. Espetro de ^{31}P -RMN

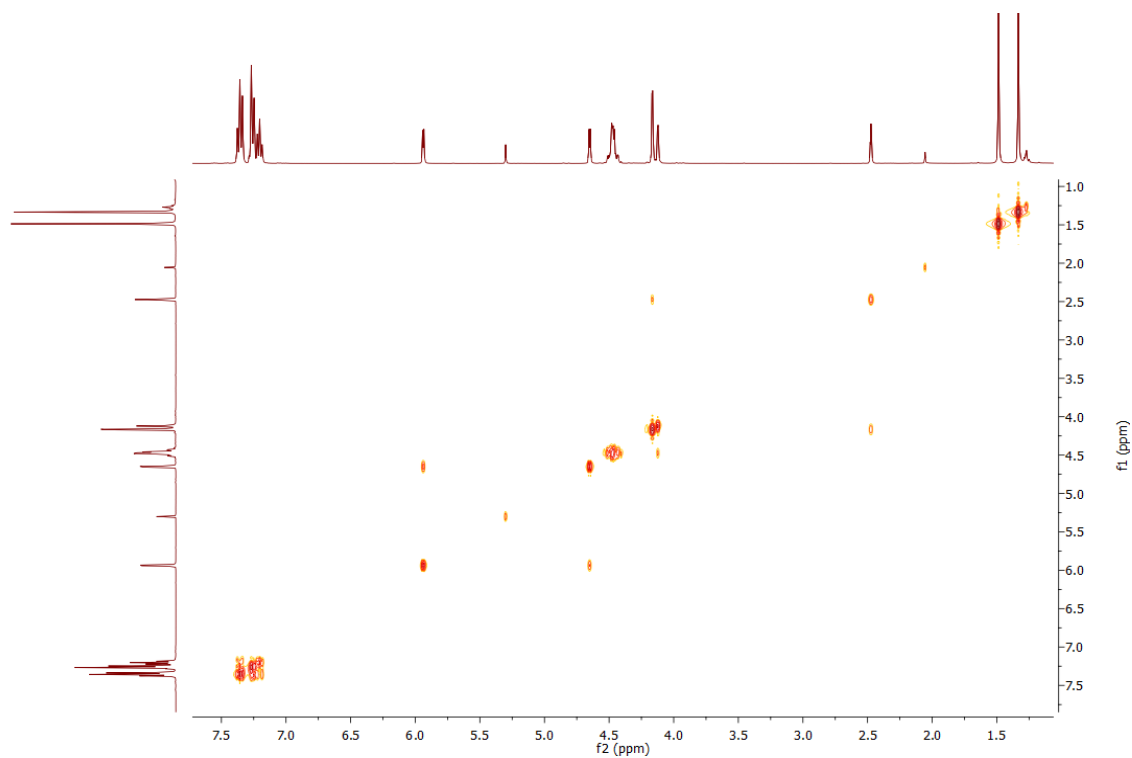


A1.22. Espetros de RMN do composto 33

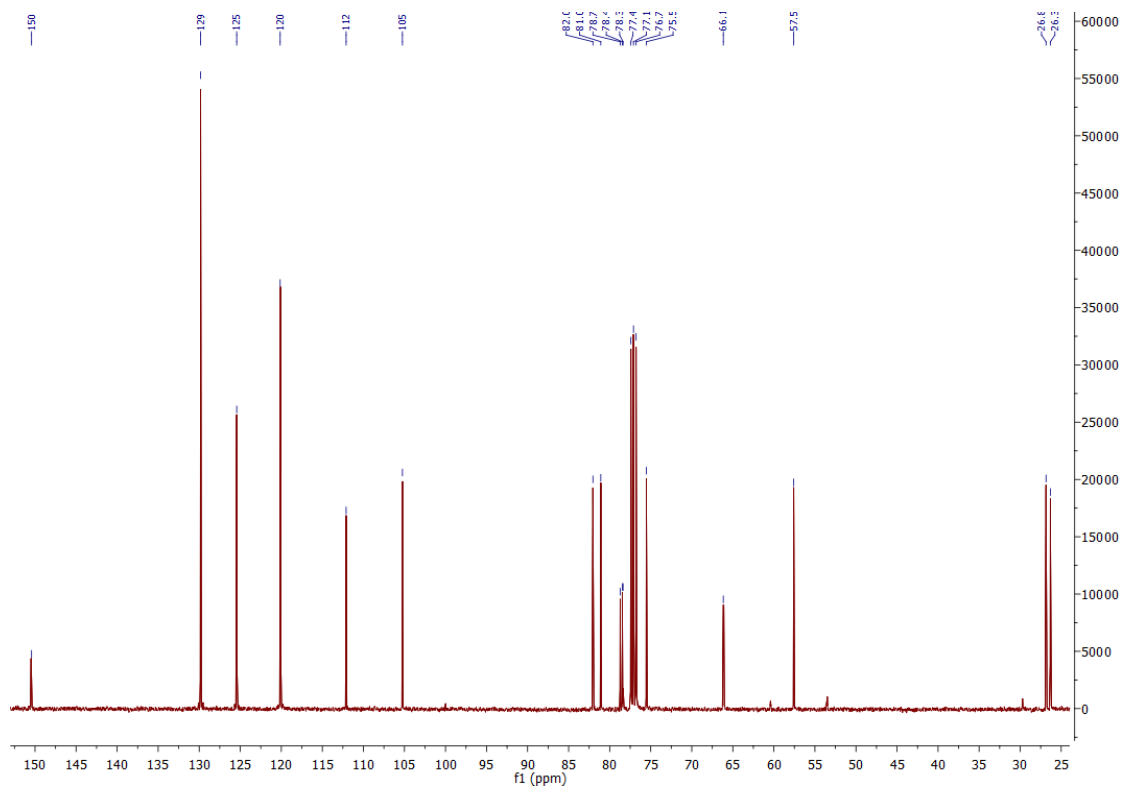
Anexo A 1.22.1. Espetro de ^1H -RMN



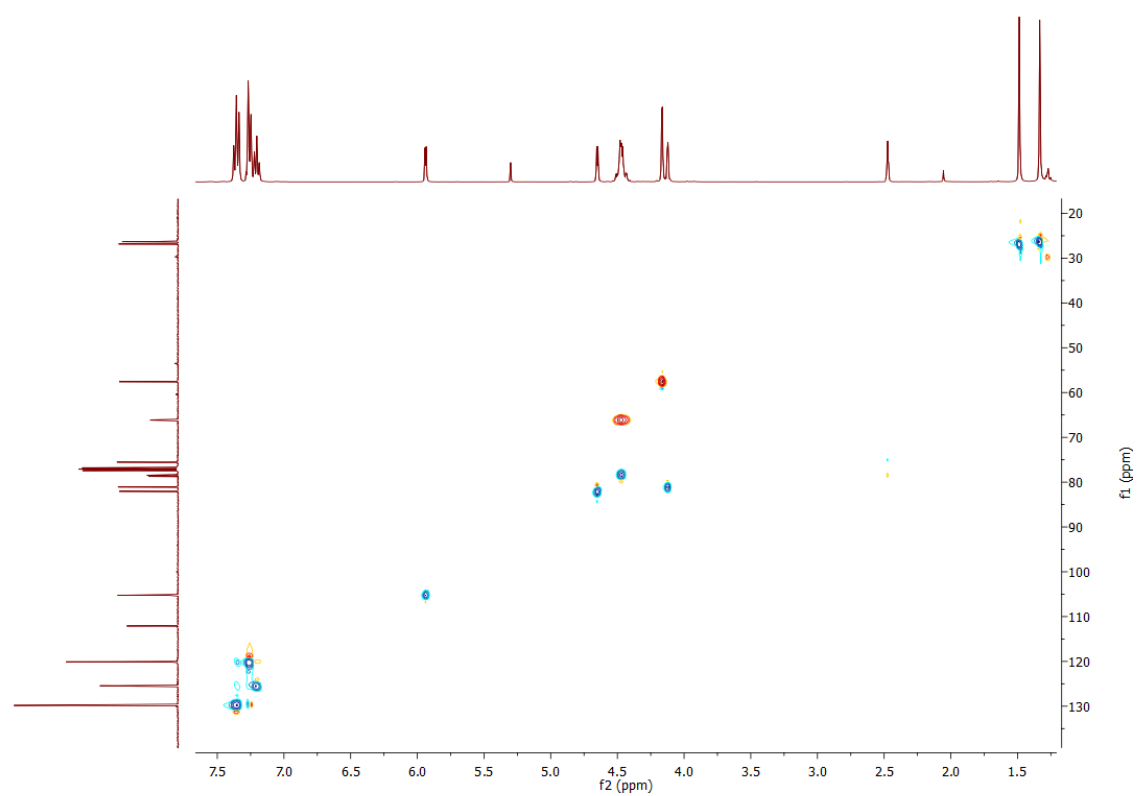
Anexo A 1.22.2. Espectro de COSY



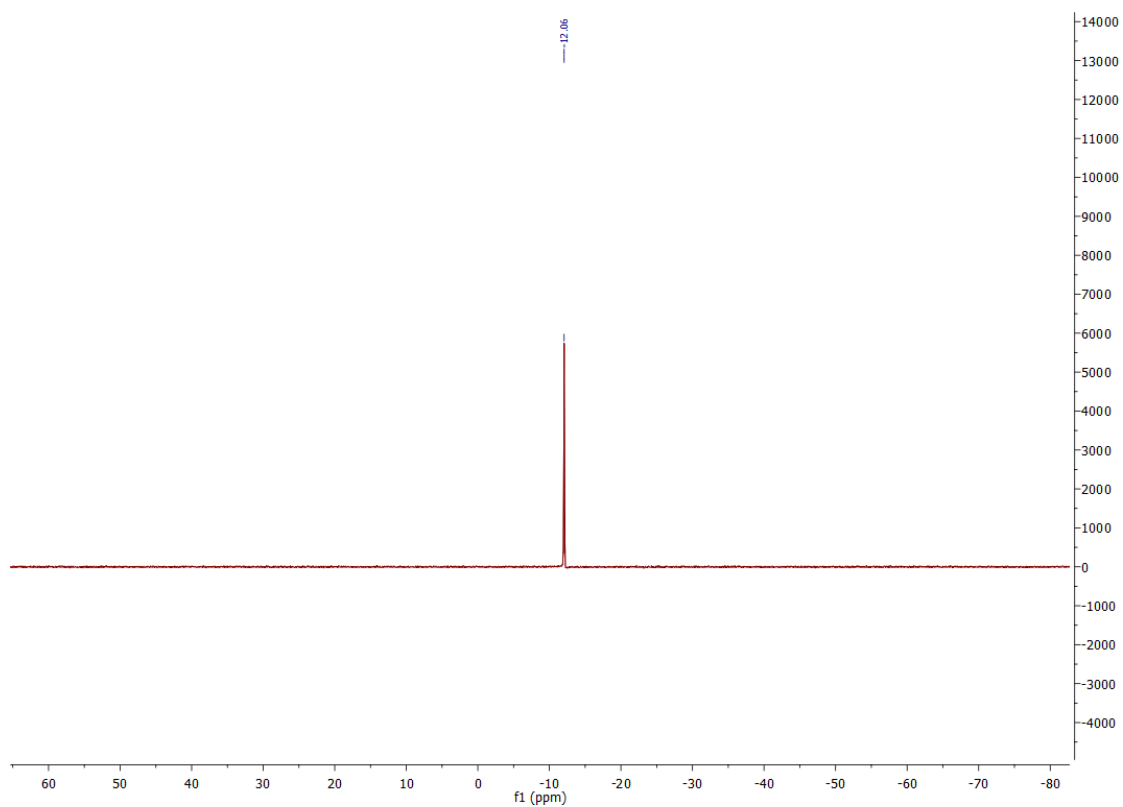
Anexo A 1.22.3. Espectro de ^{13}C -RMN



Anexo A 1.22.4. Espectro de HSQC

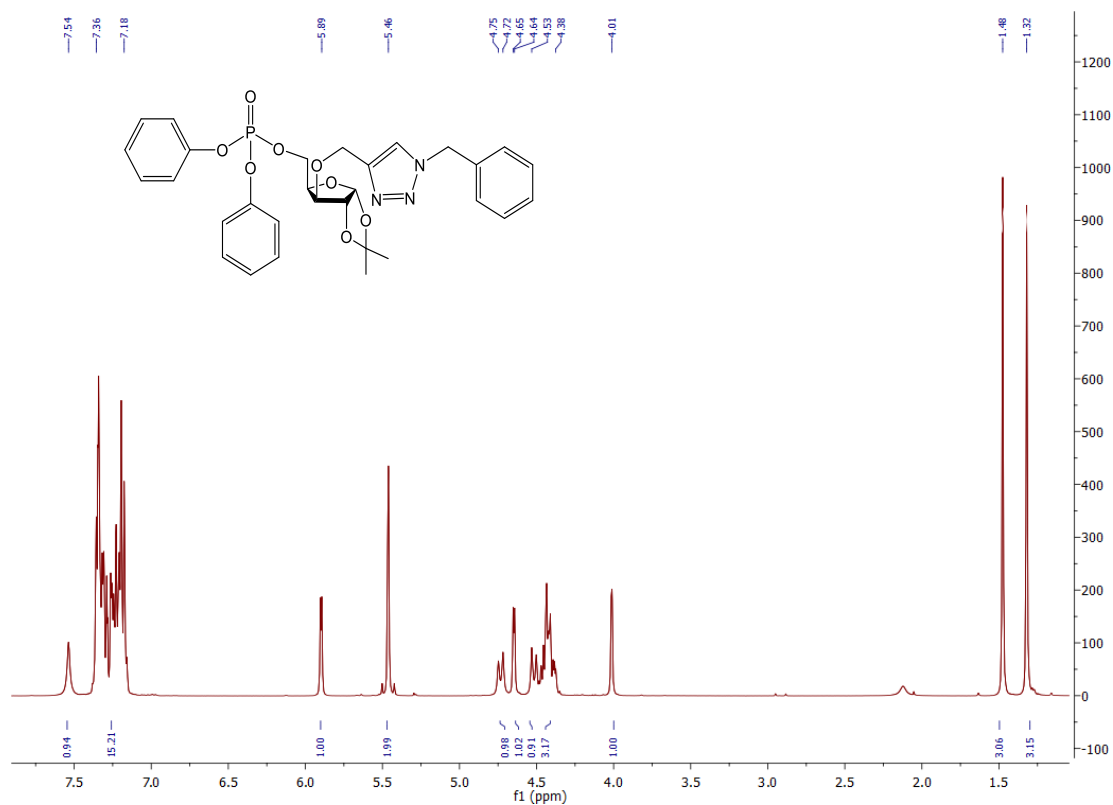


Anexo A 1.22.5. Espectro de ^{31}P -RMN

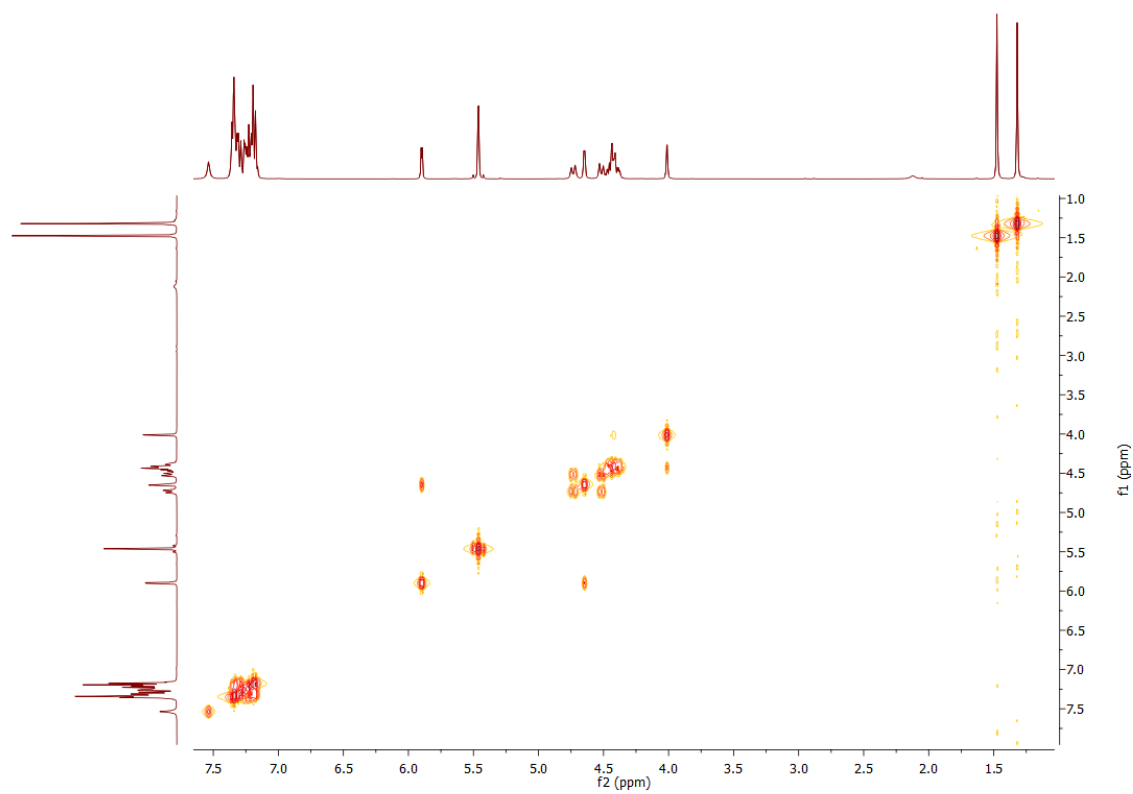


A1.23. Espetros de RMN do composto 34

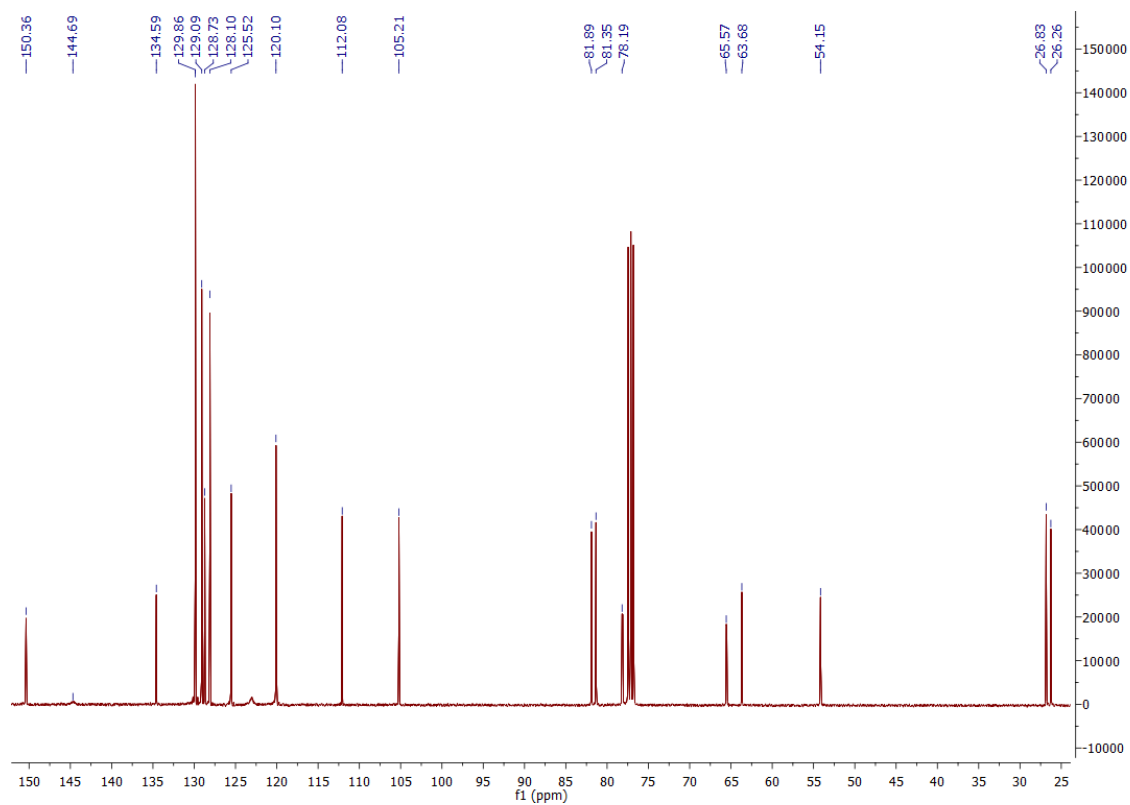
Anexo A 1.23.1. Espectro de ^1H -RMN



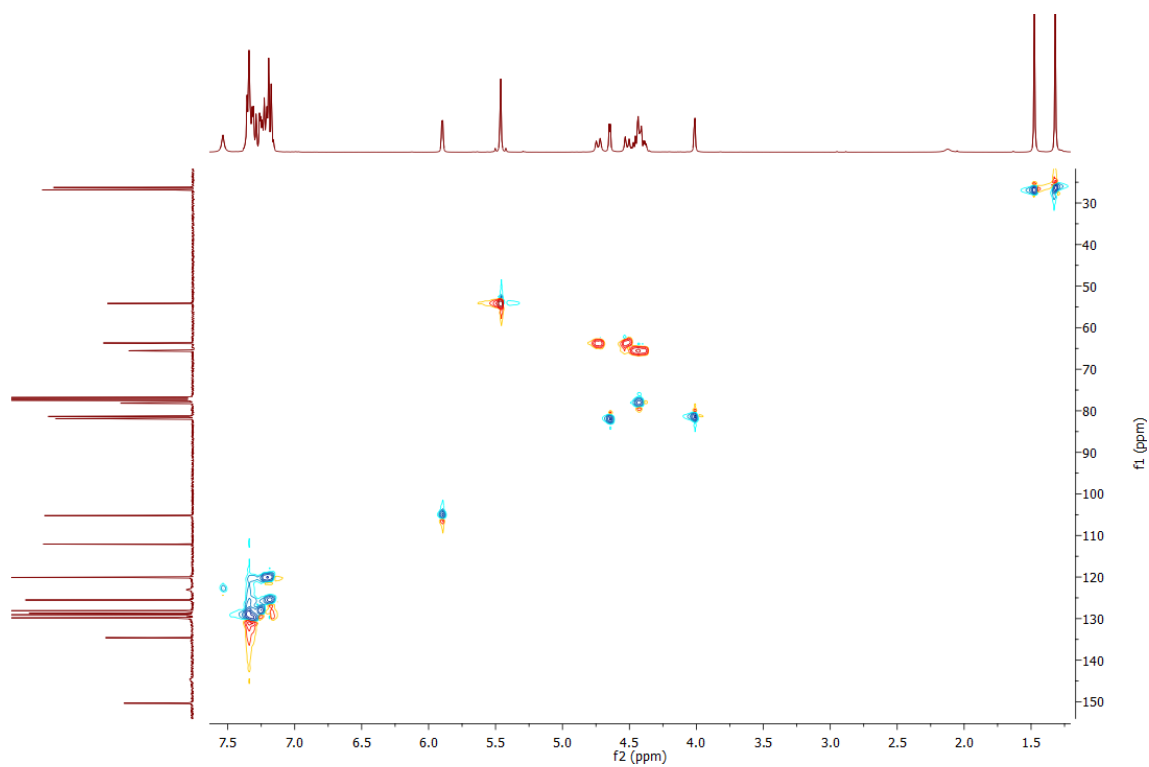
Anexo A 1.23.2. Espectro de COSY



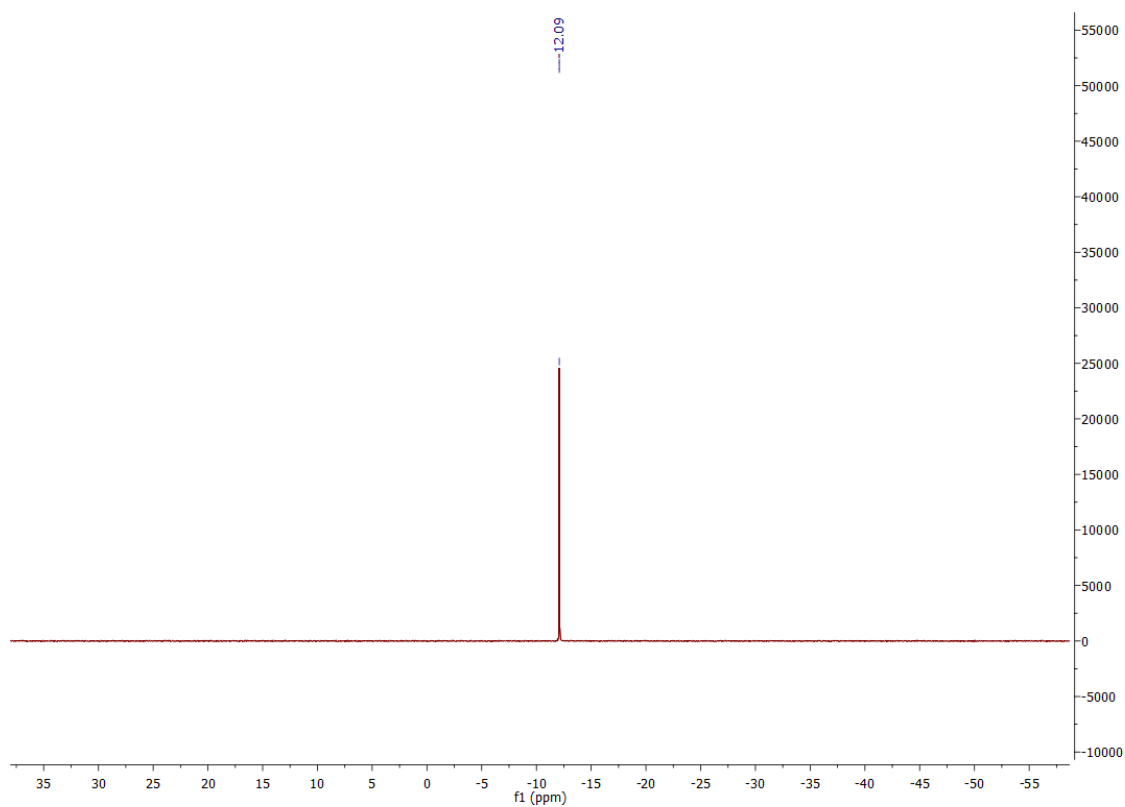
Anexo A 1.23.3. Espectro de ^{13}C -RMN



Anexo A 1.23.4. Espectro de HSQC

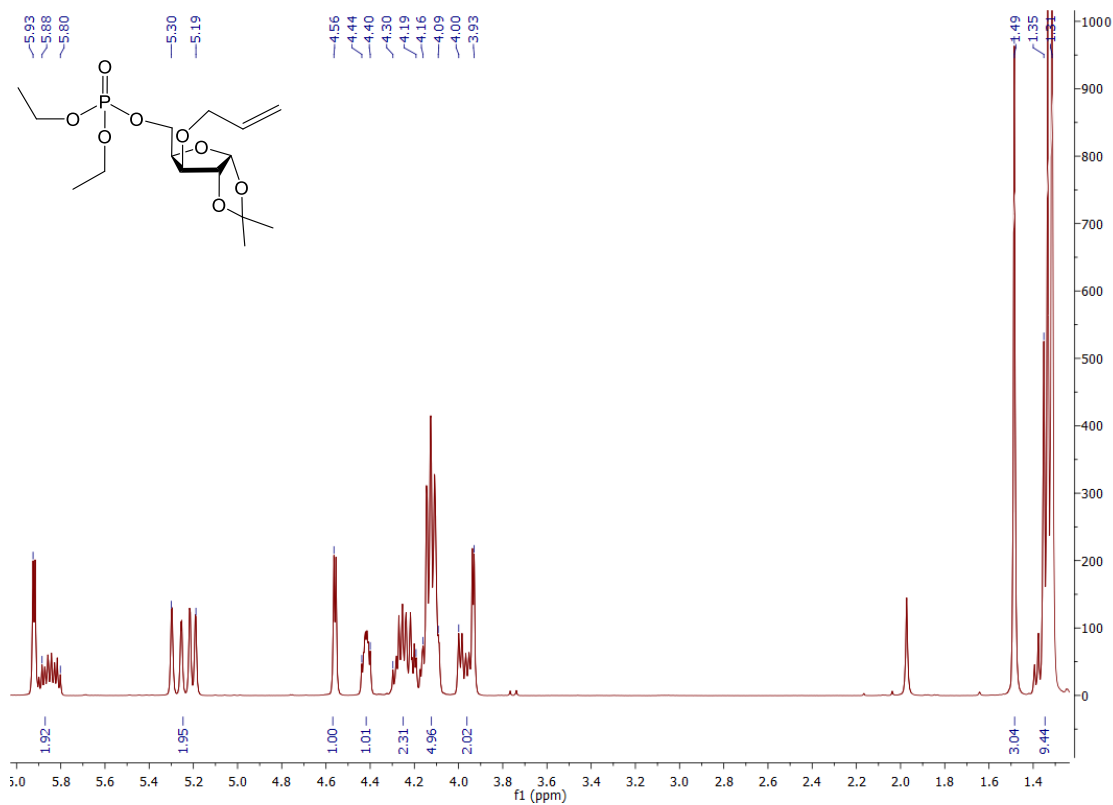


Anexo A 1.23.5. Espectro de ^{31}P -RMN

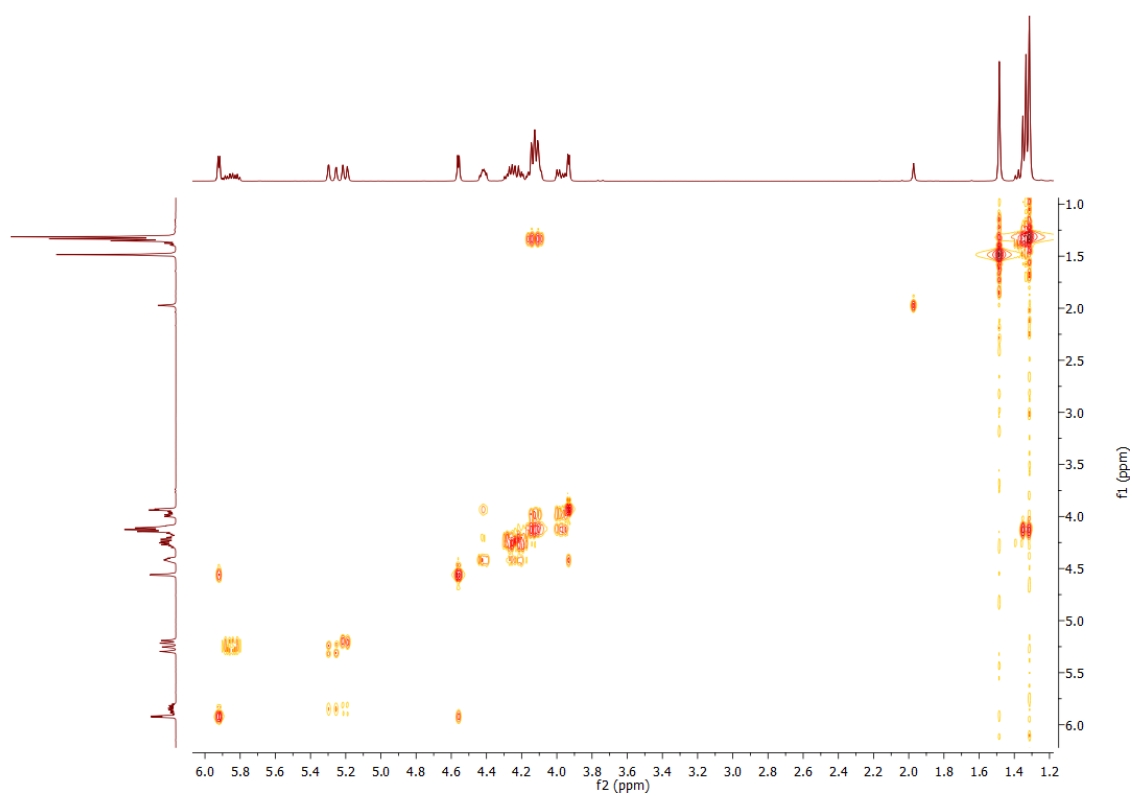


A1.24. Espectros de RMN do composto 35

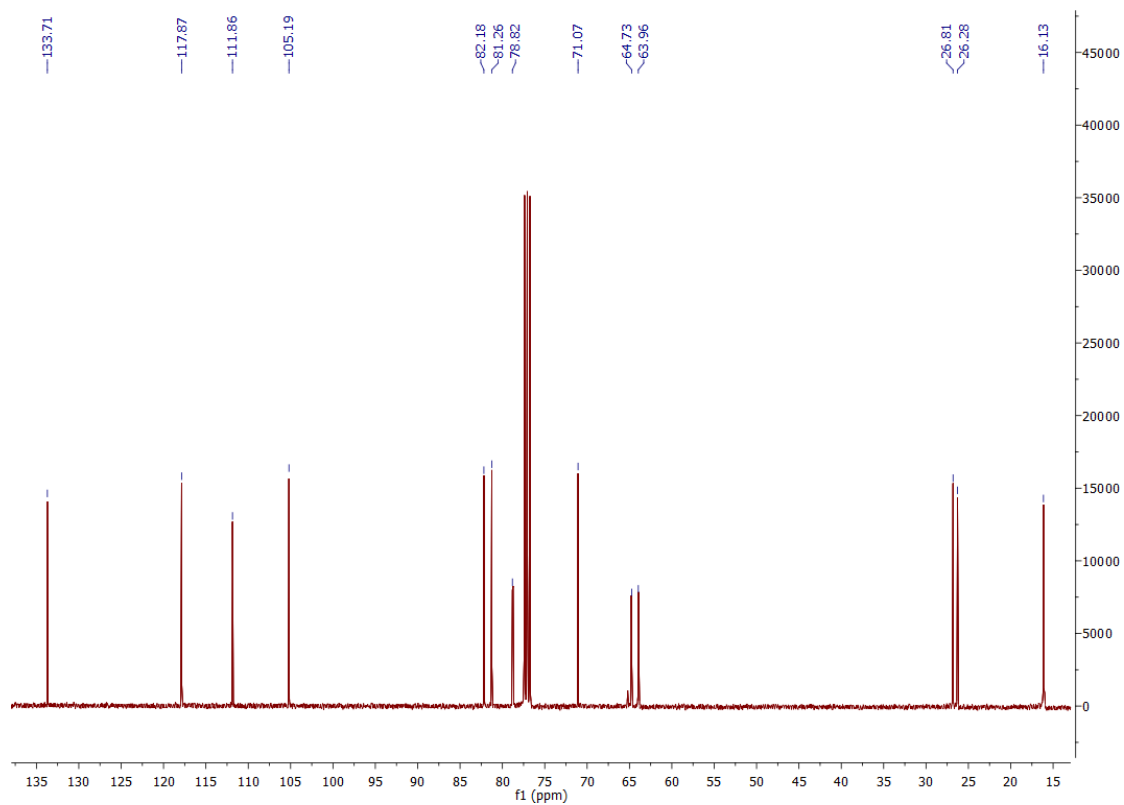
Anexo A 1.24.1. Espectro de ^1H -RMN



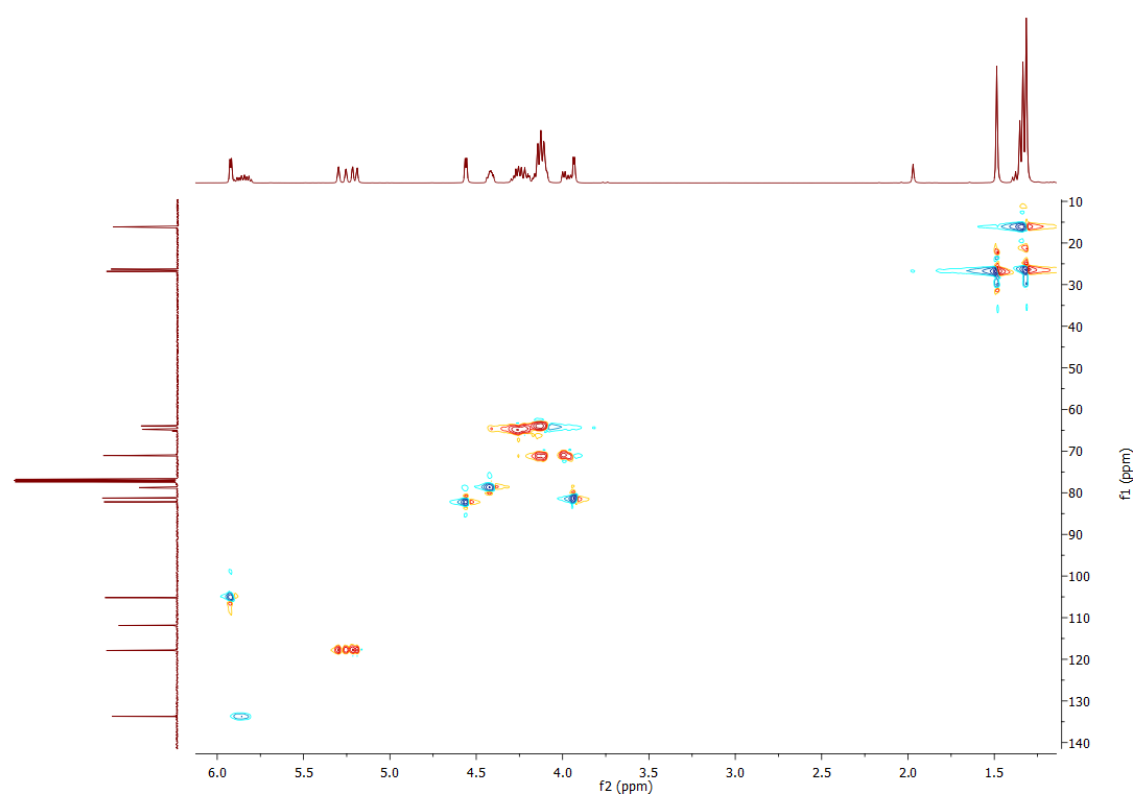
Anexo A 1.24.2. Espectro de COSY



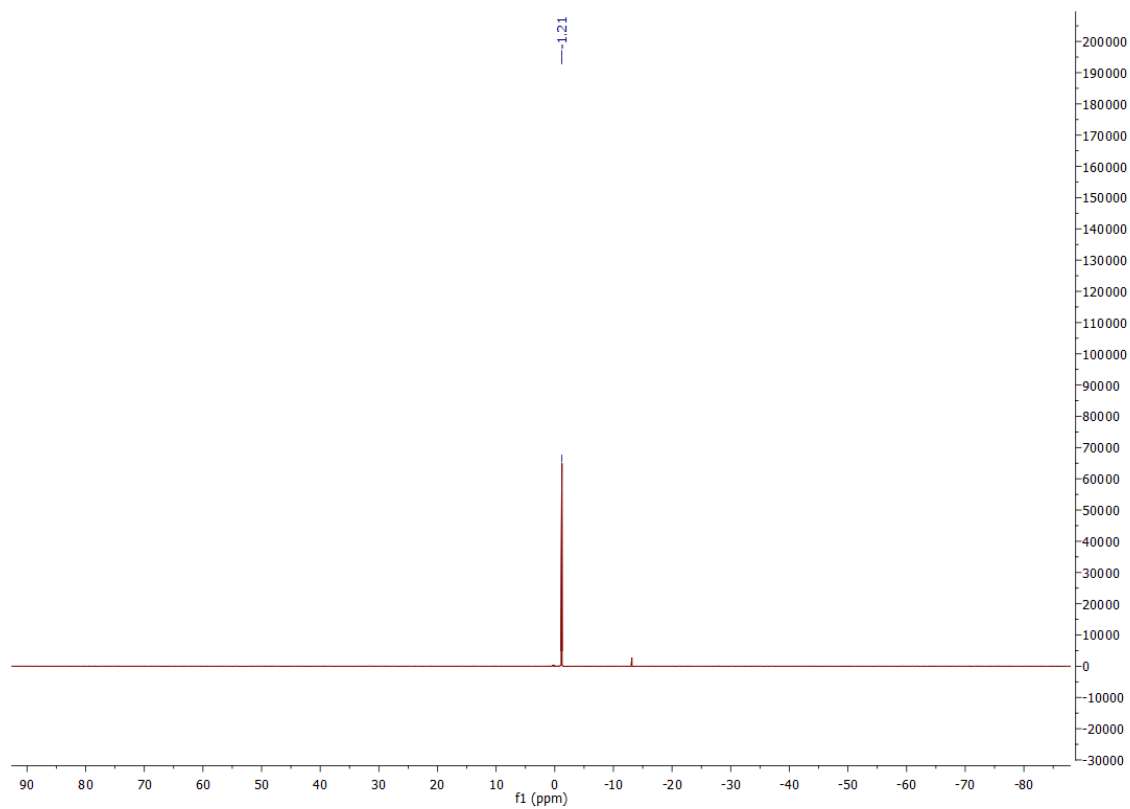
Anexo A 1.24.3. Espectro de ^{13}C -RMN



Anexo A 1.24.4. Espectro de HSQC

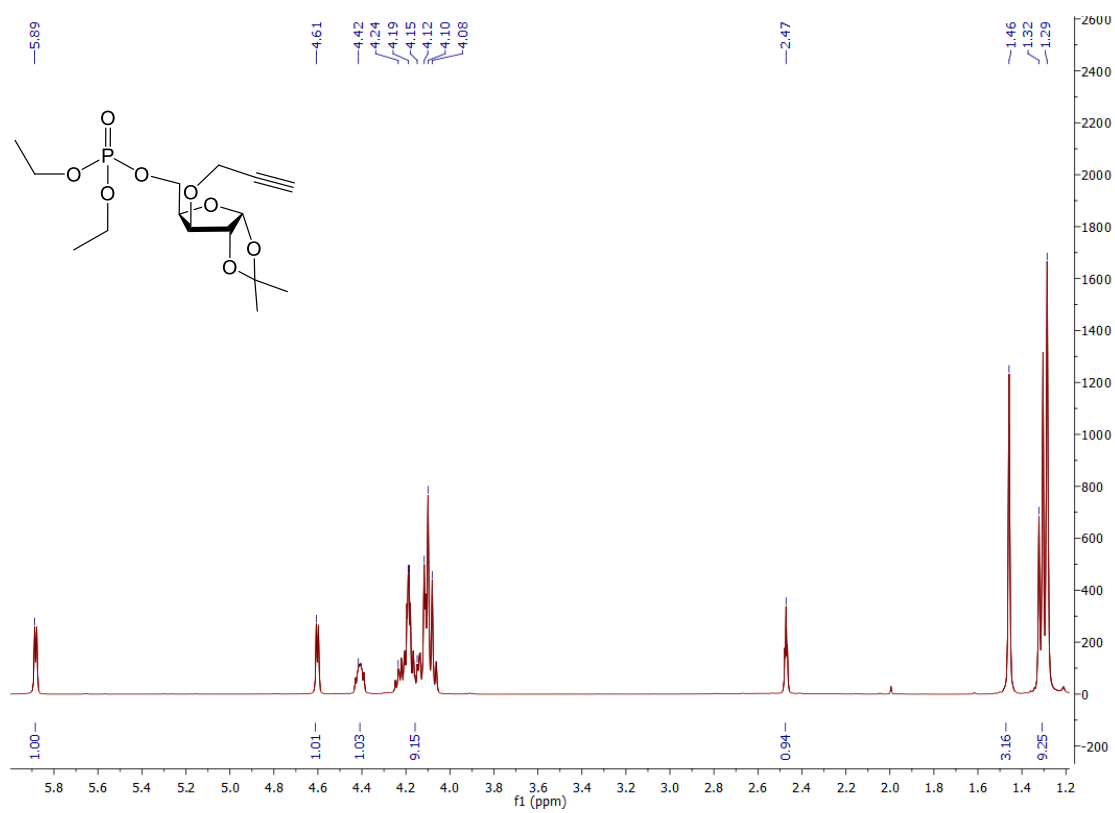


Anexo A 1.24.5. Espectro de ^{31}P -RMN

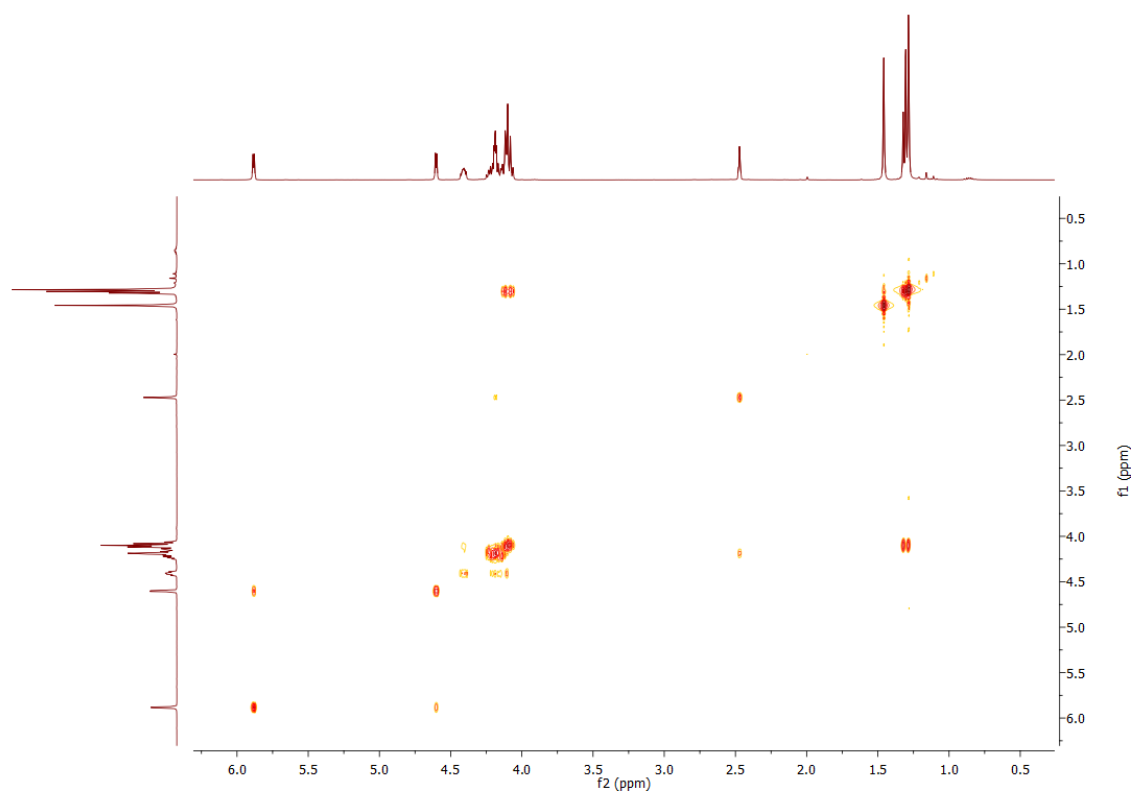


A1.25. Espetros de RMN do composto 36

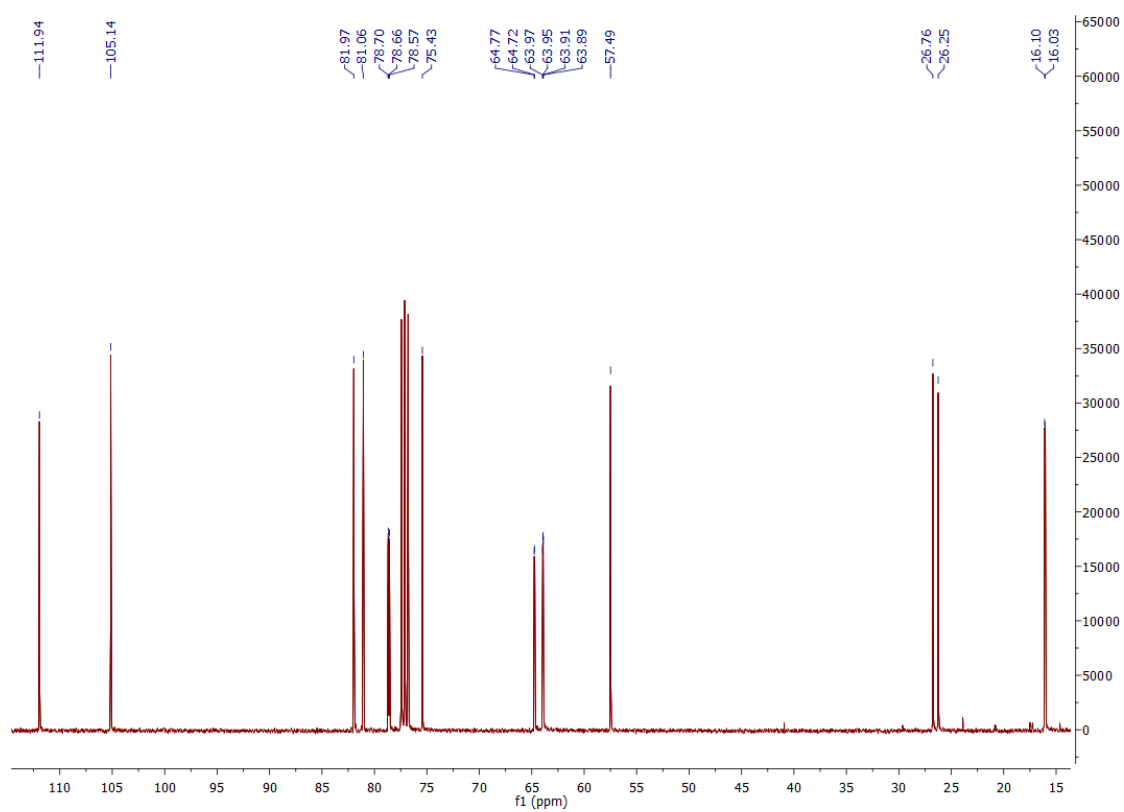
Anexo A 1.25.1. Espectro de ^1H -RMN



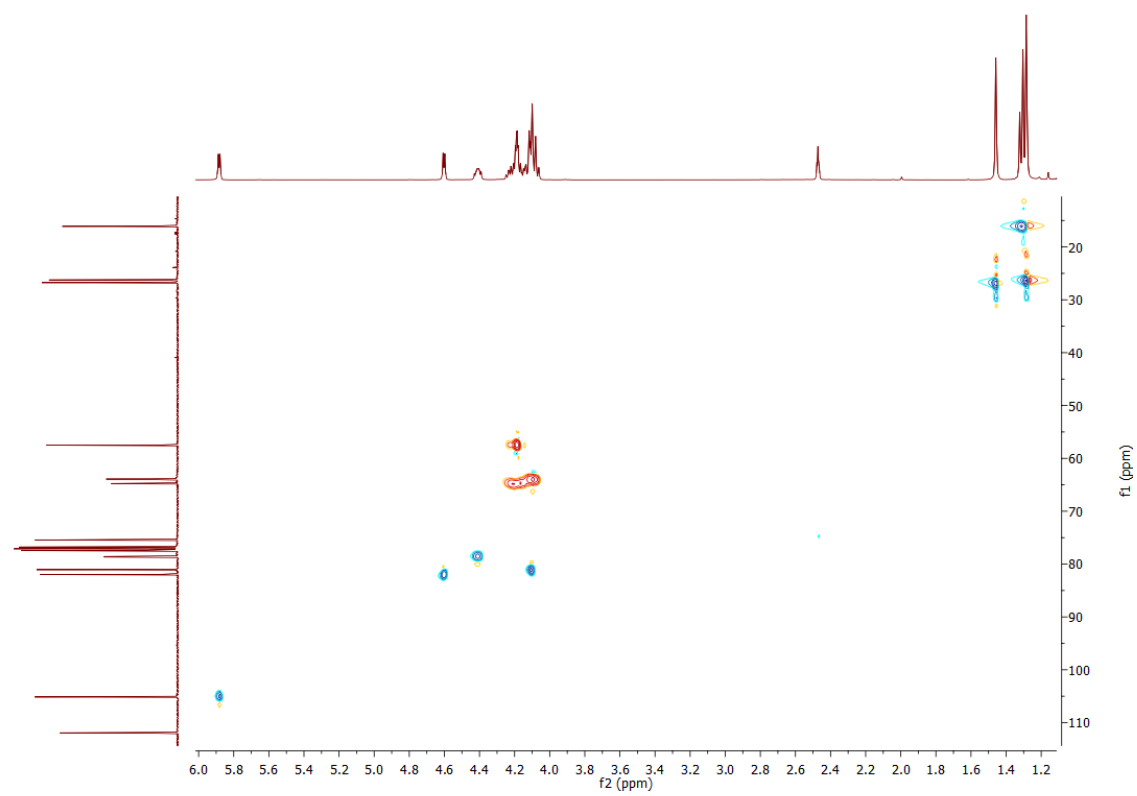
Anexo A 1.25.2. Espectro de COSY



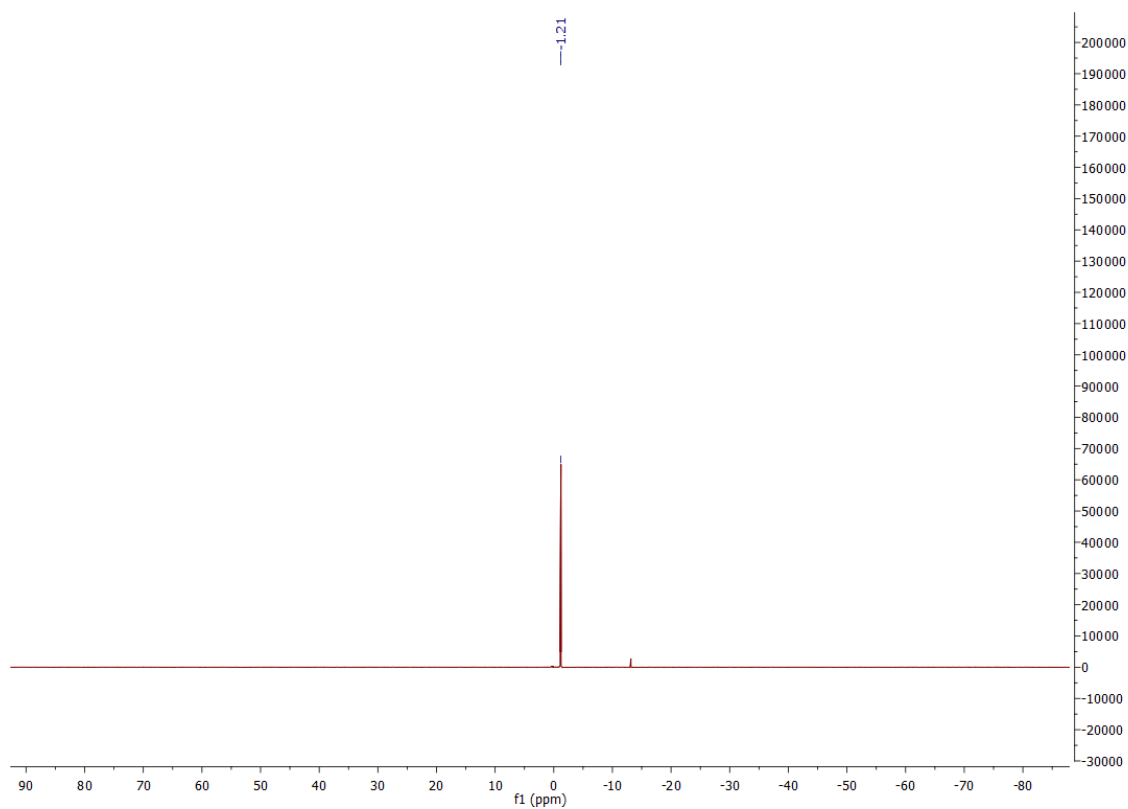
Anexo A 1.25.3. Espectro de ^{13}C -RMN



Anexo A 1.25.4. Espectro de HSQC

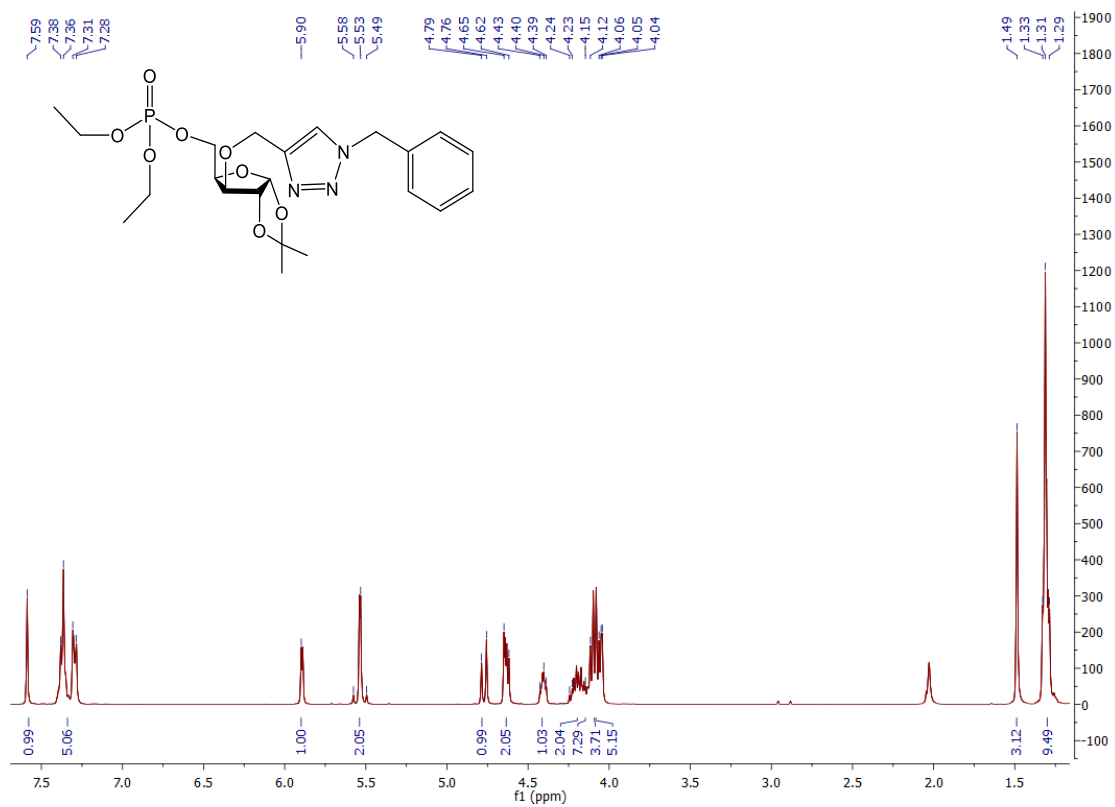


Anexo A 1.25.5. Espectro de ^{31}P -RMN

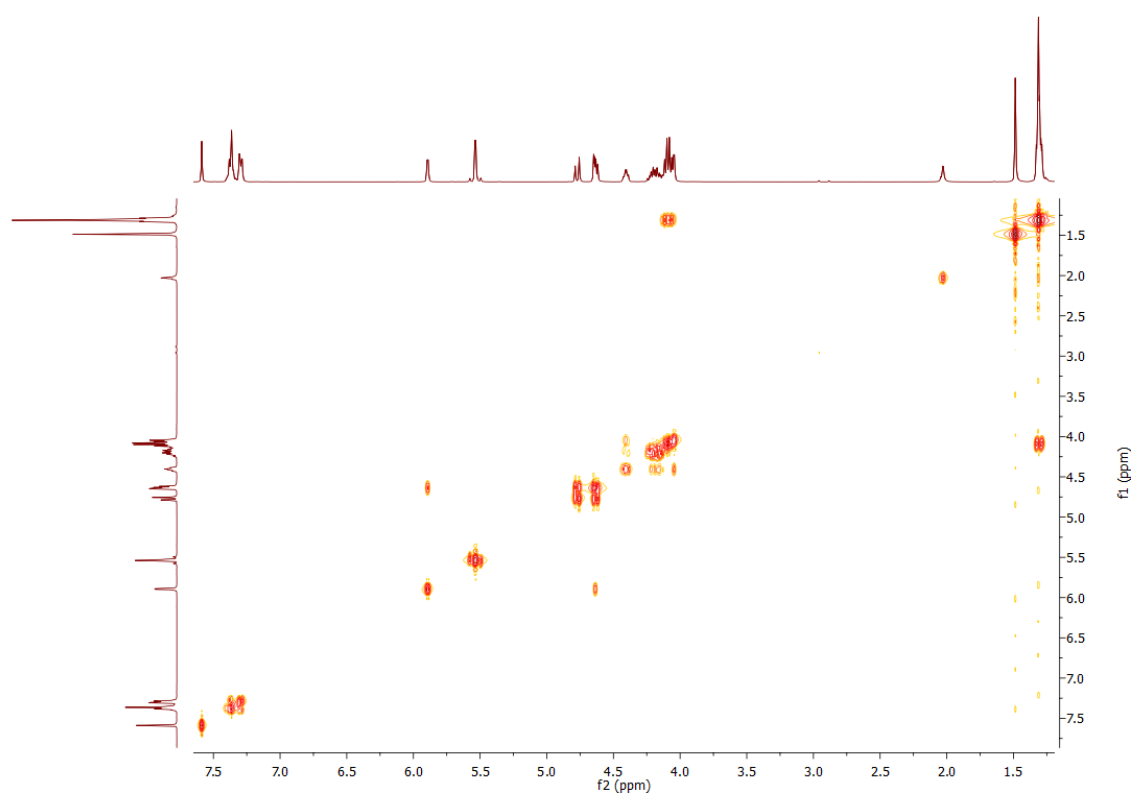


A1.26. Espectros de RMN do composto 37

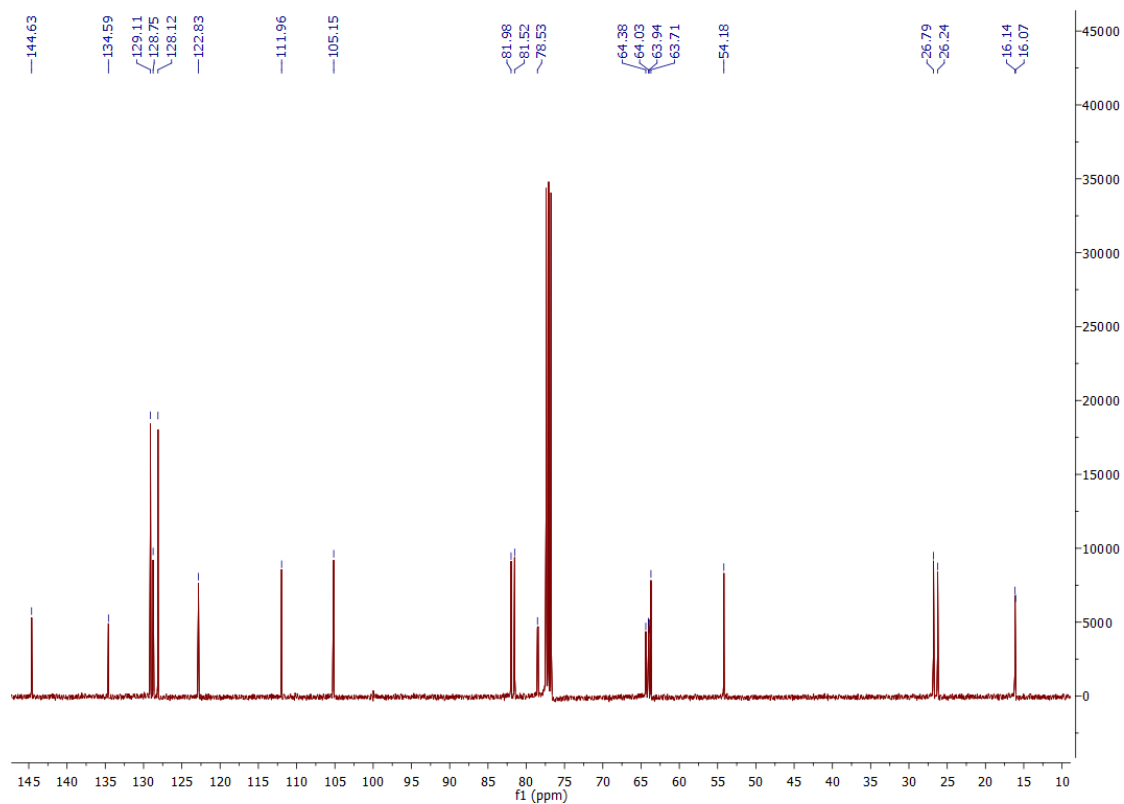
Anexo A 1.26.1. Espectro de ^1H -RMN



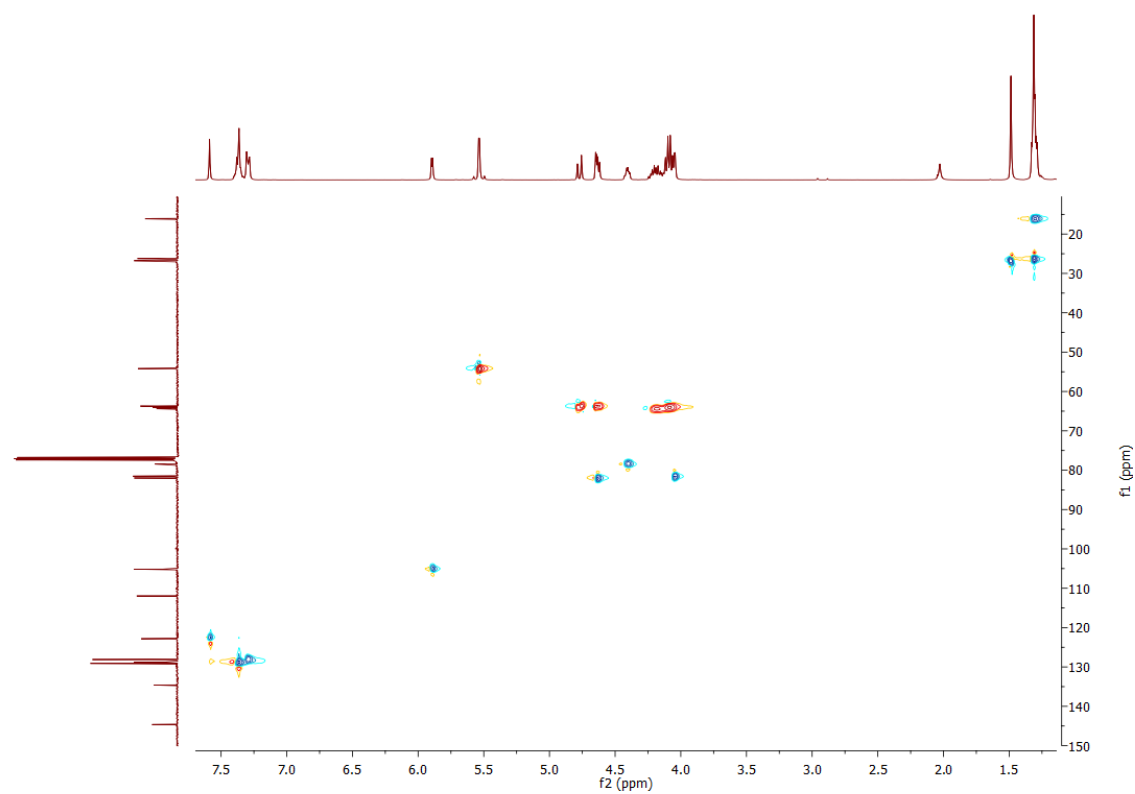
Anexo A 1.26.2. Espectro de COSY



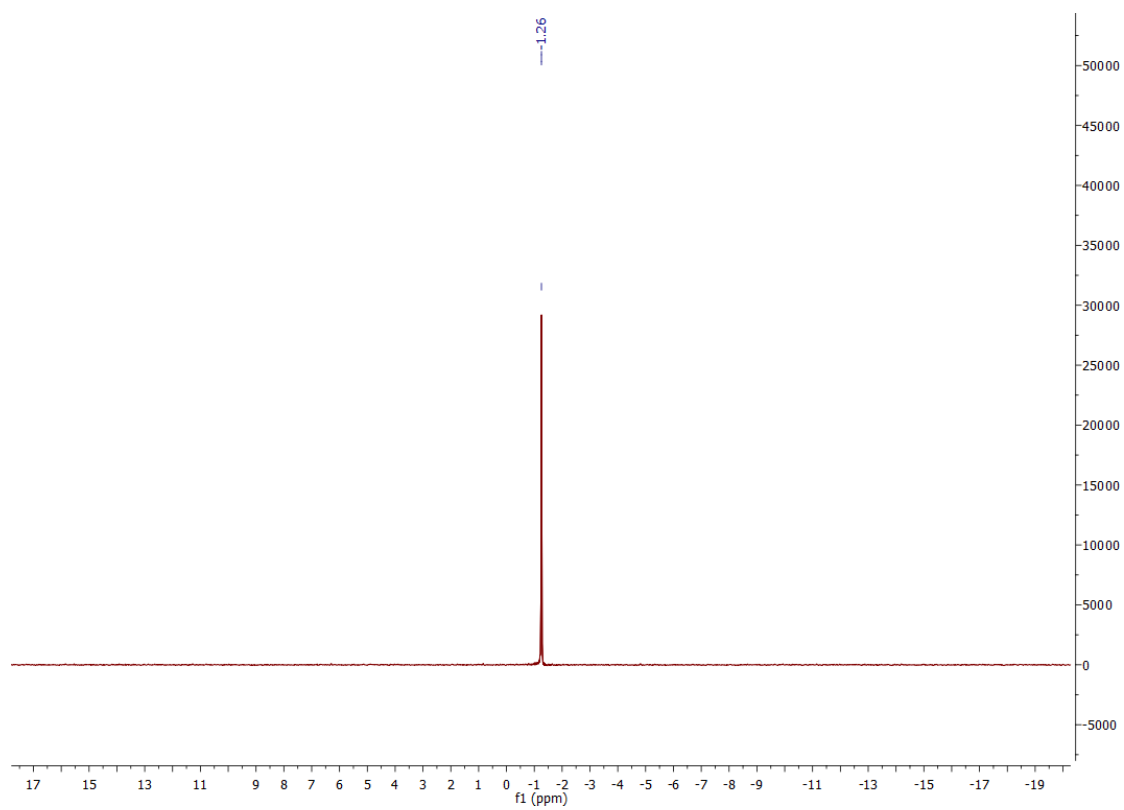
Anexo A 1.26.3. Espectro de ^{13}C -RMN



Anexo A 1.26.4. Espectro de HSQC

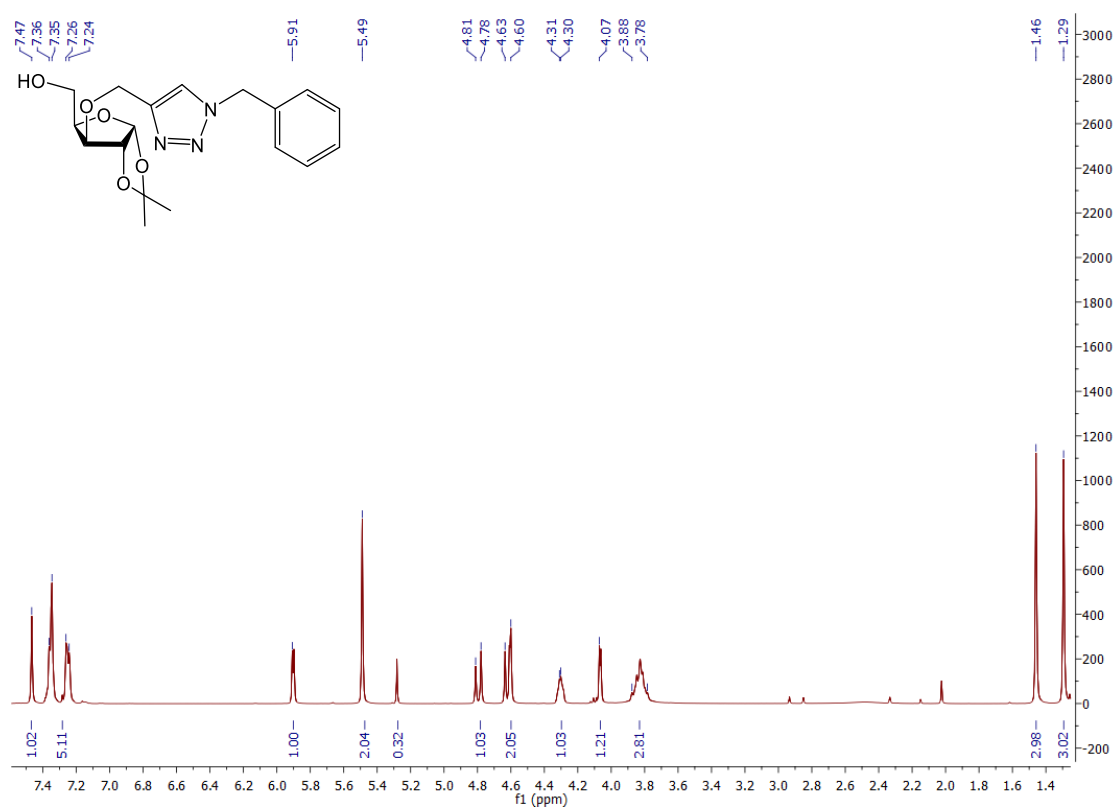


Anexo A 1.26.5. Espectro de ^{31}P -RMN

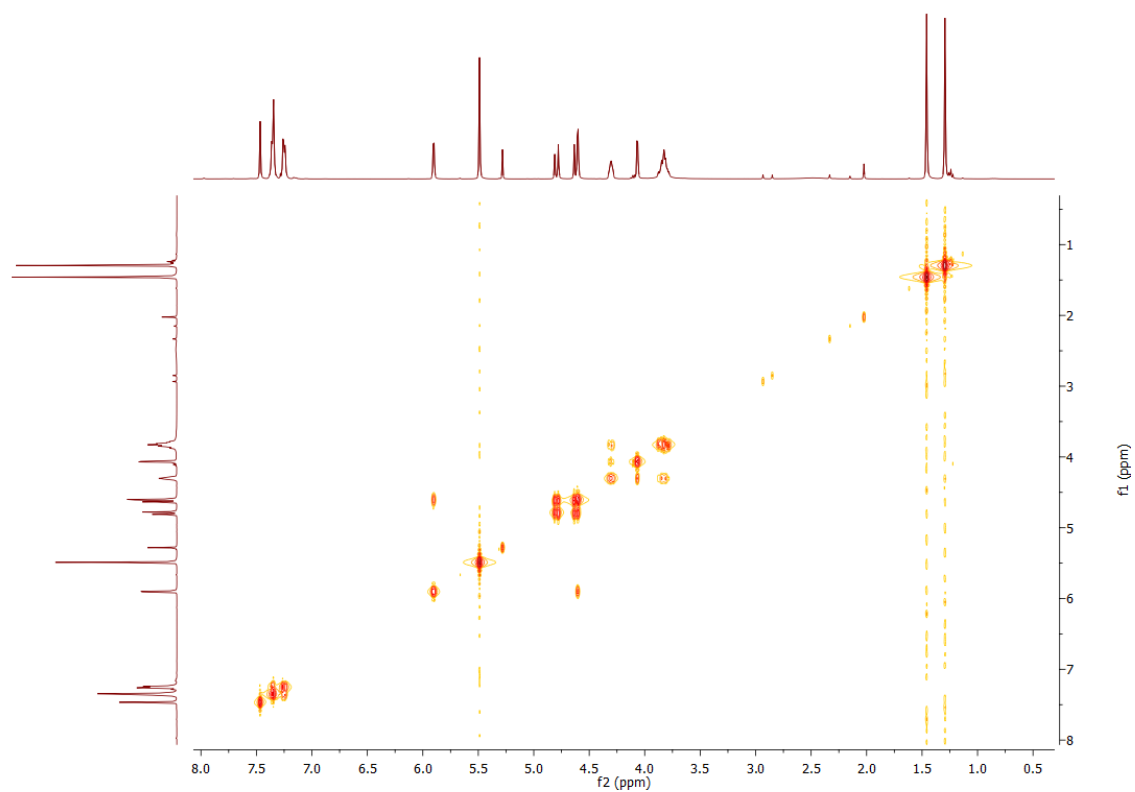


A1.27. Espetros de RMN do composto 38

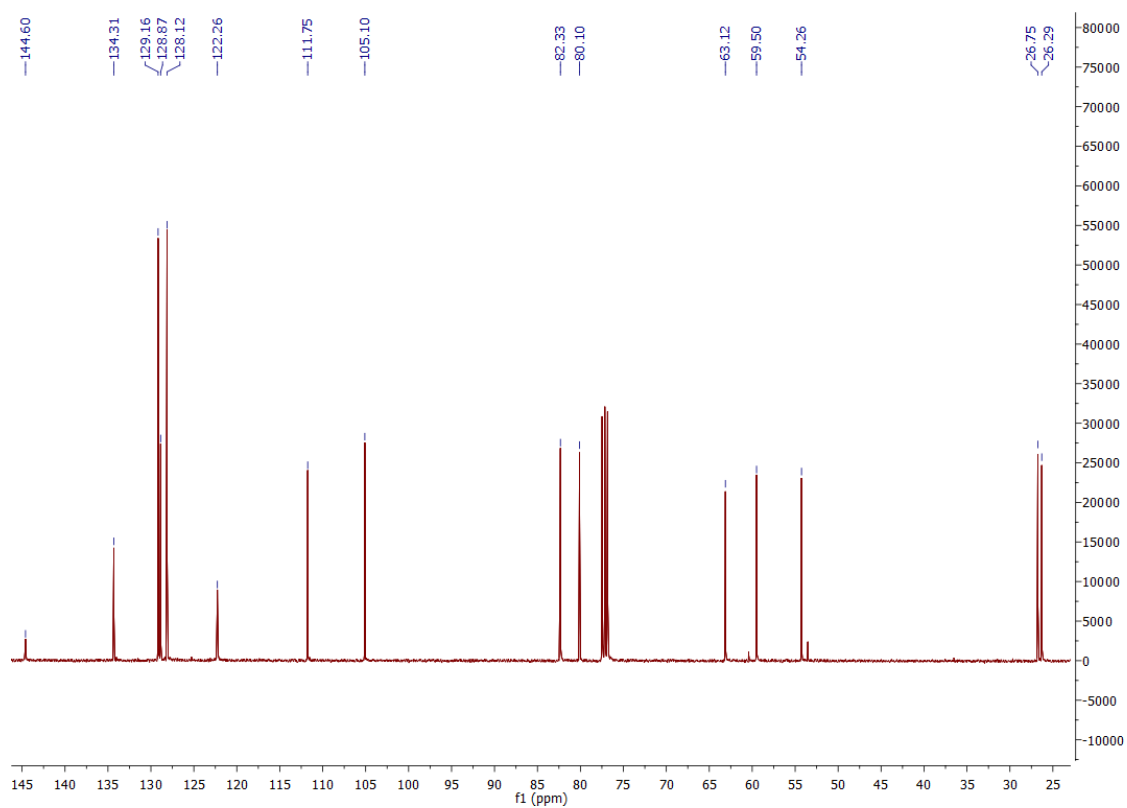
Anexo A 1.27.1. Espectro de ^1H -RMN



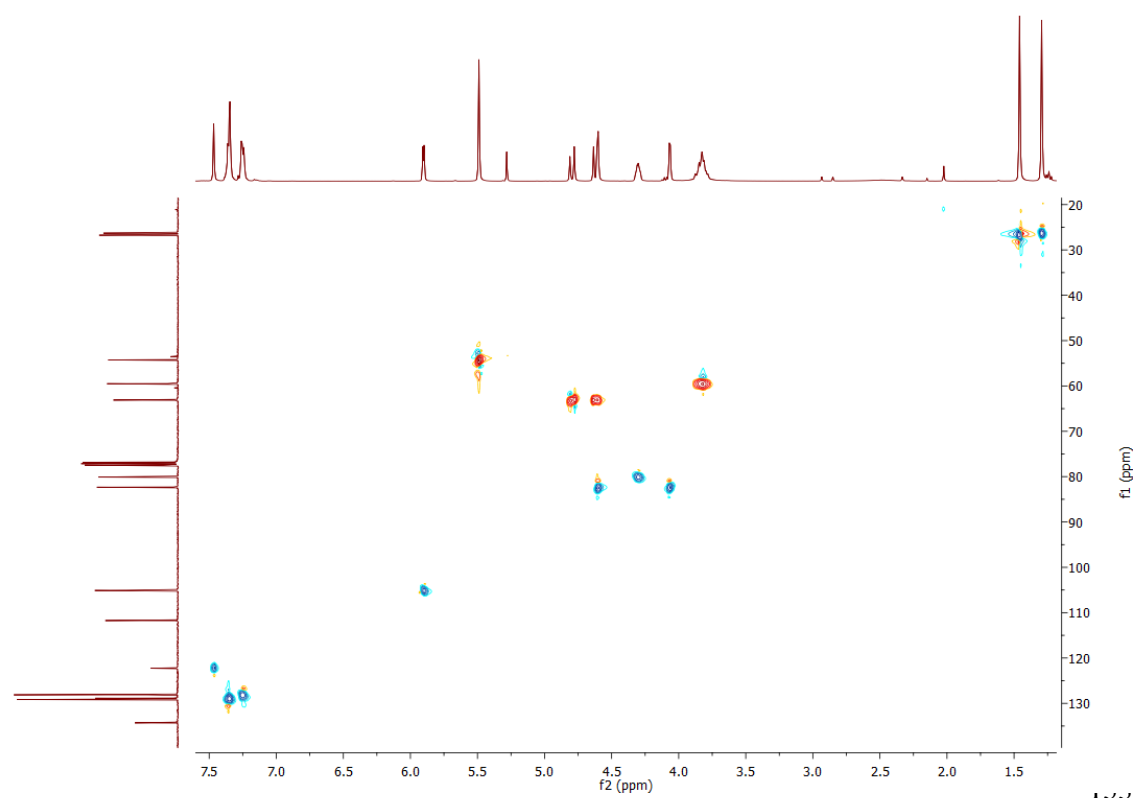
Anexo A 1.27.2. Espectro de COSY



Anexo A 1.27.3. Espectro de ^{13}C -RMN

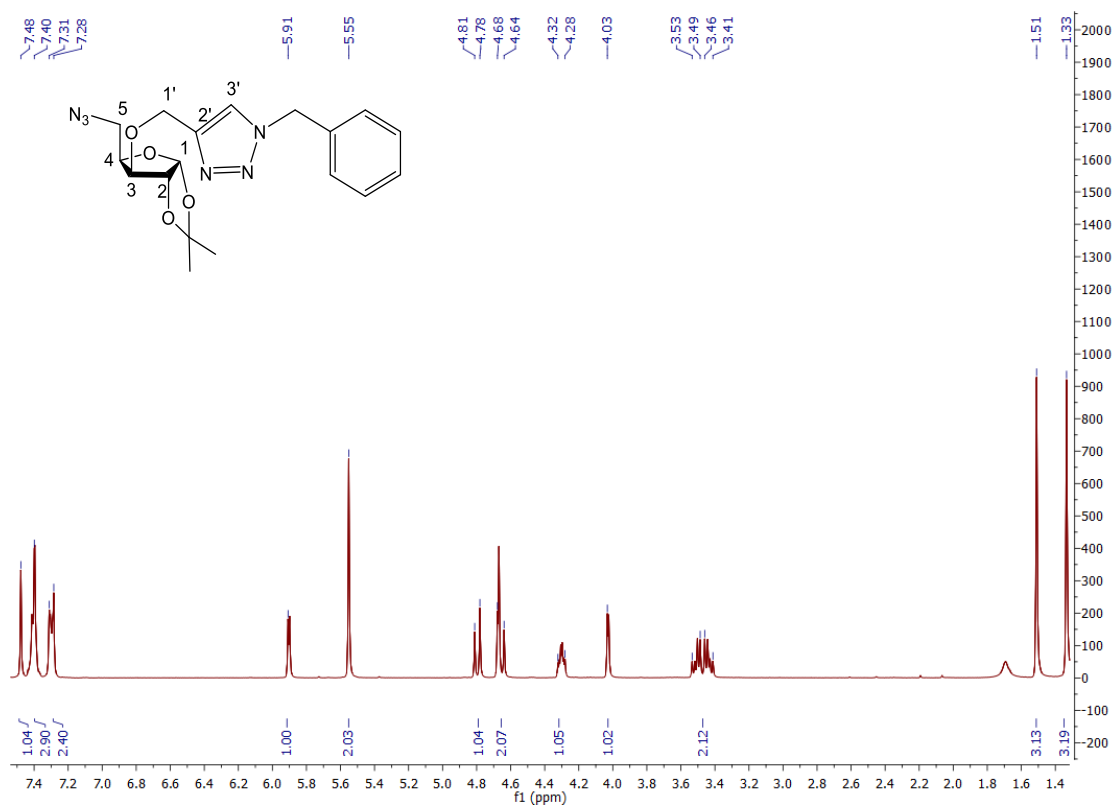


Anexo A 1.27.4. Espectro de HSQC

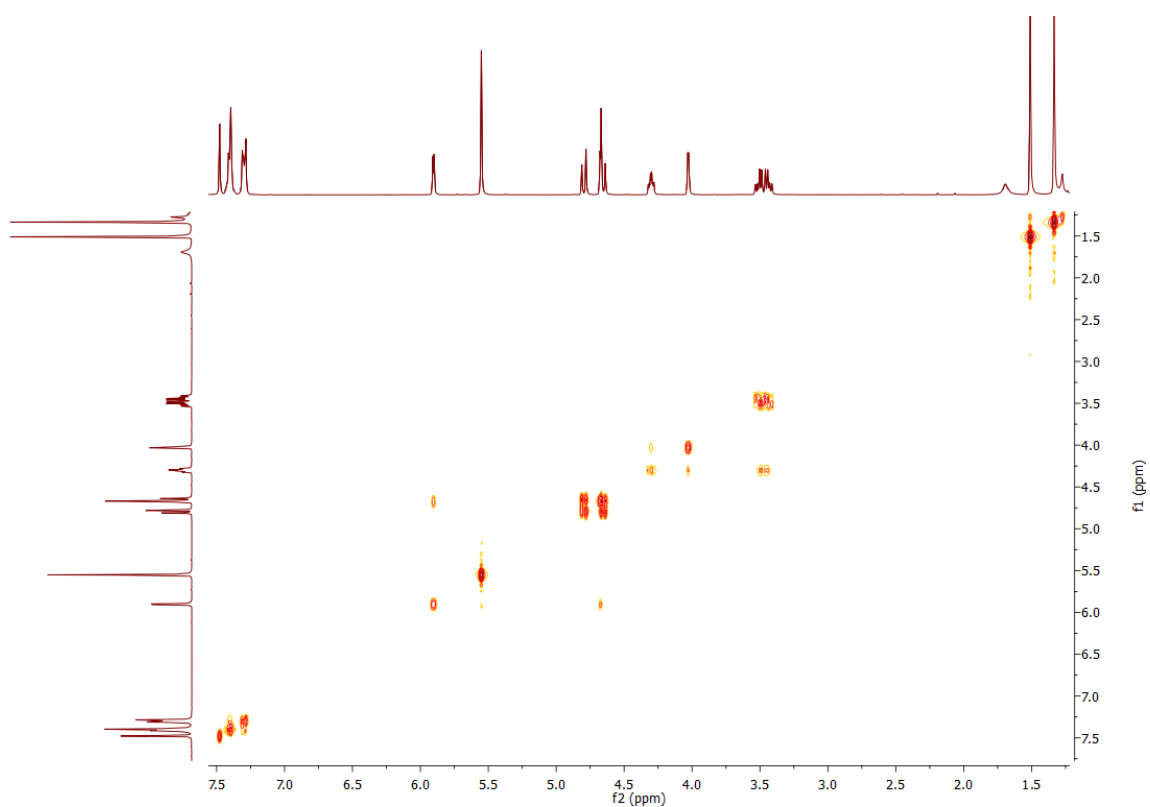


A1.28. Espectros de RMN do composto 39

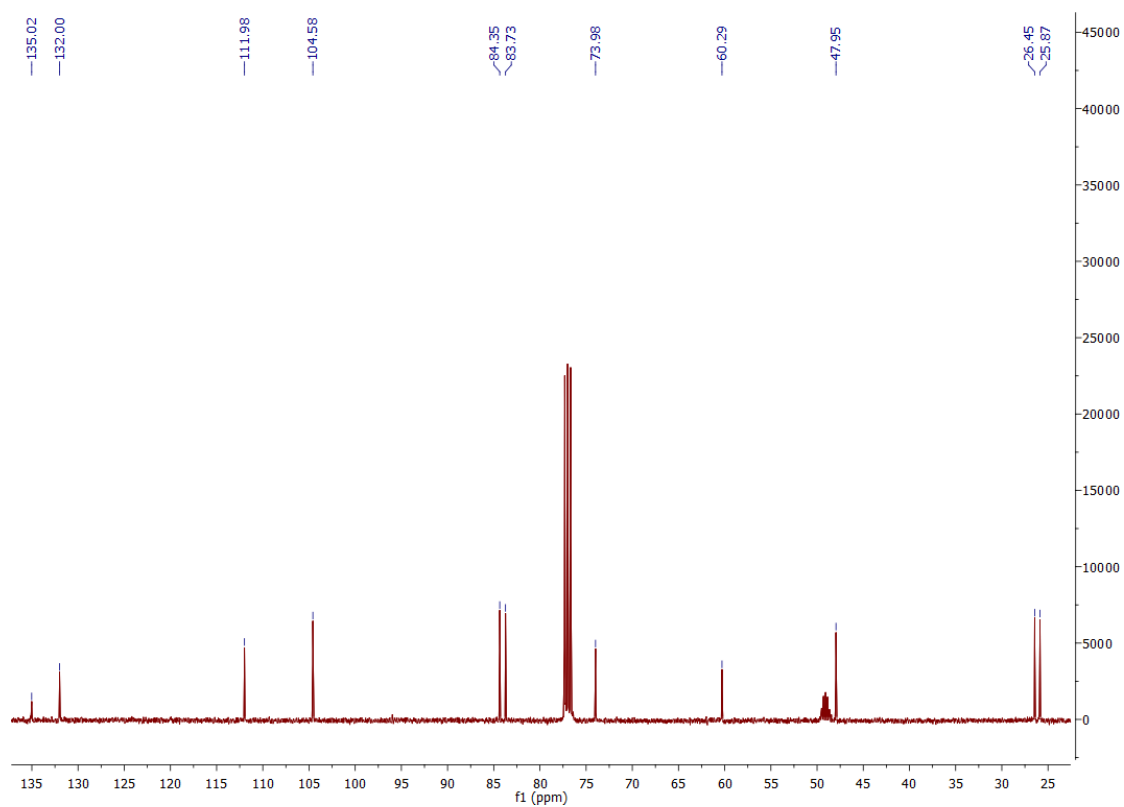
Anexo A 1.28.1. Espectro de ^1H -RMN



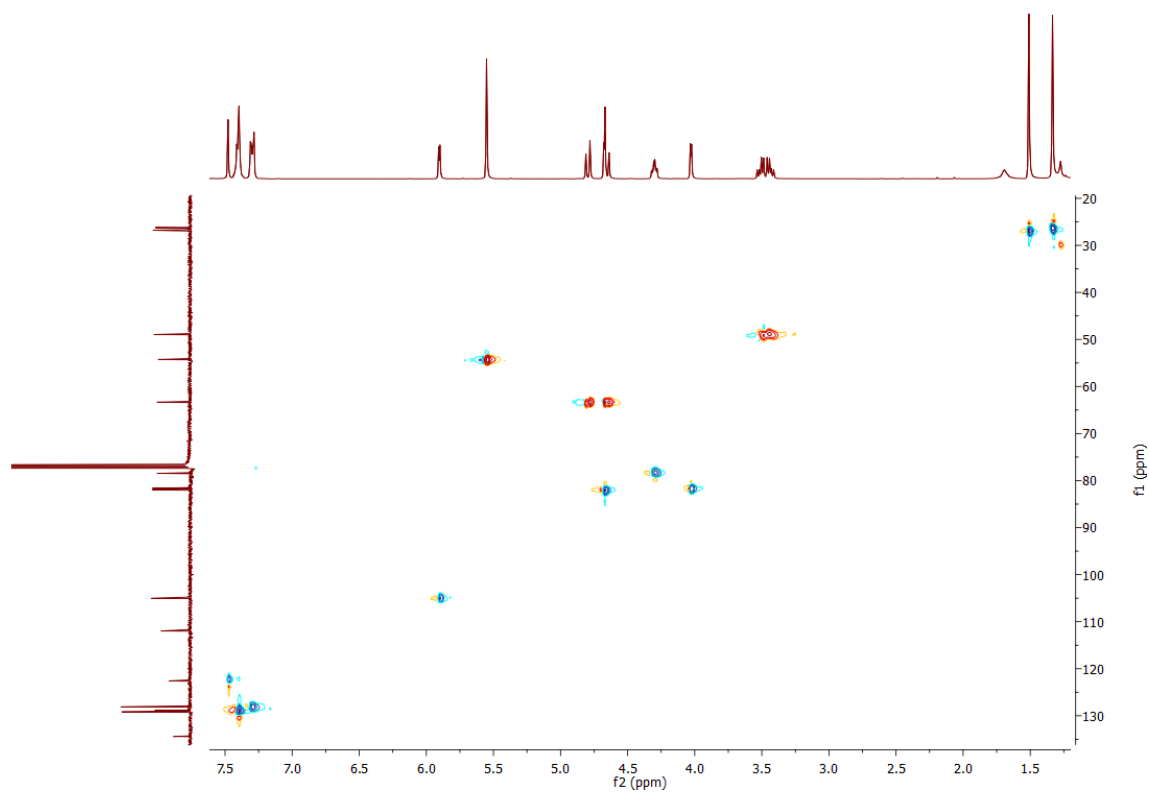
Anexo A 1.28.2. Espectro de COSY



Anexo A 1.28.3. Espectro de ^{13}C -RMN

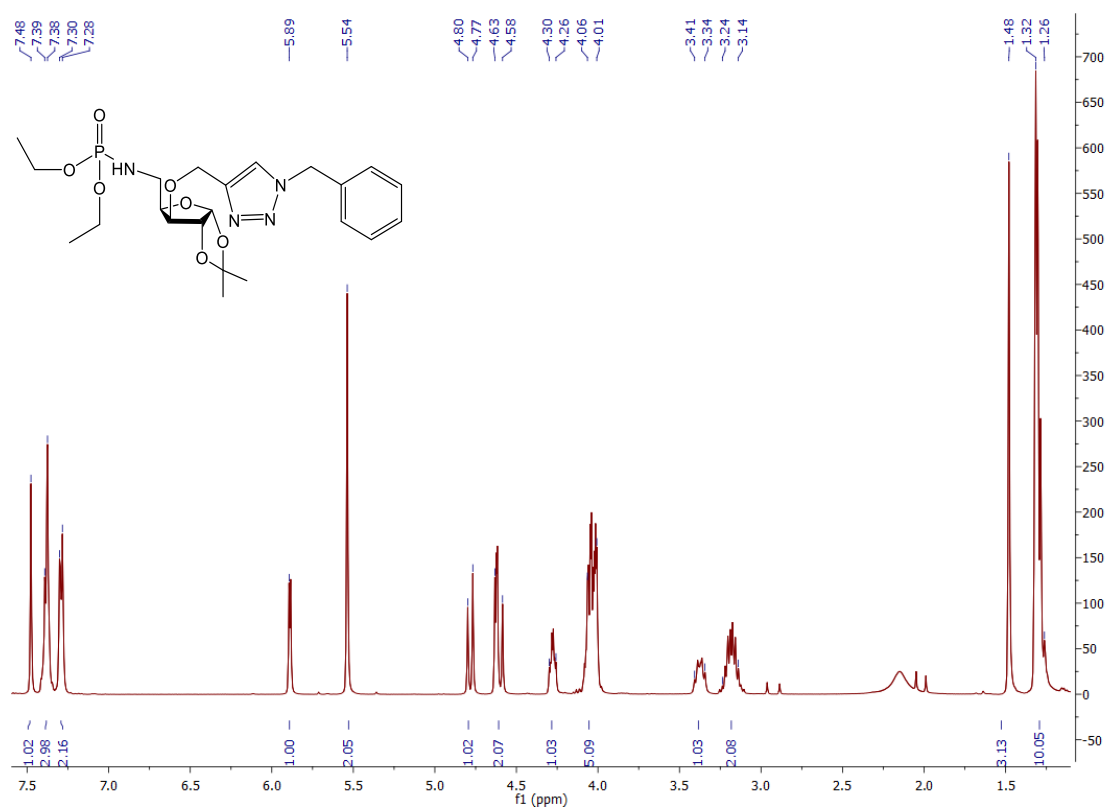


Anexo A 1.28.4. Espectro de HSQC

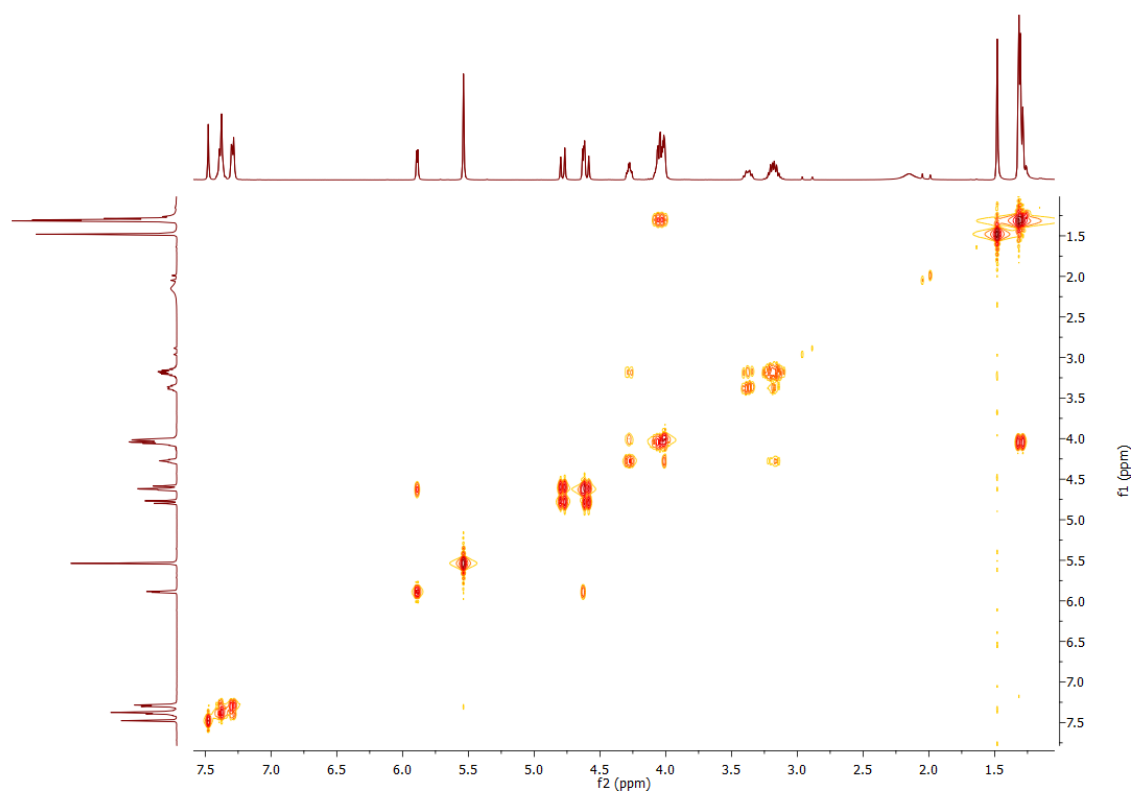


A1.29. Espetros de RMN do composto 40

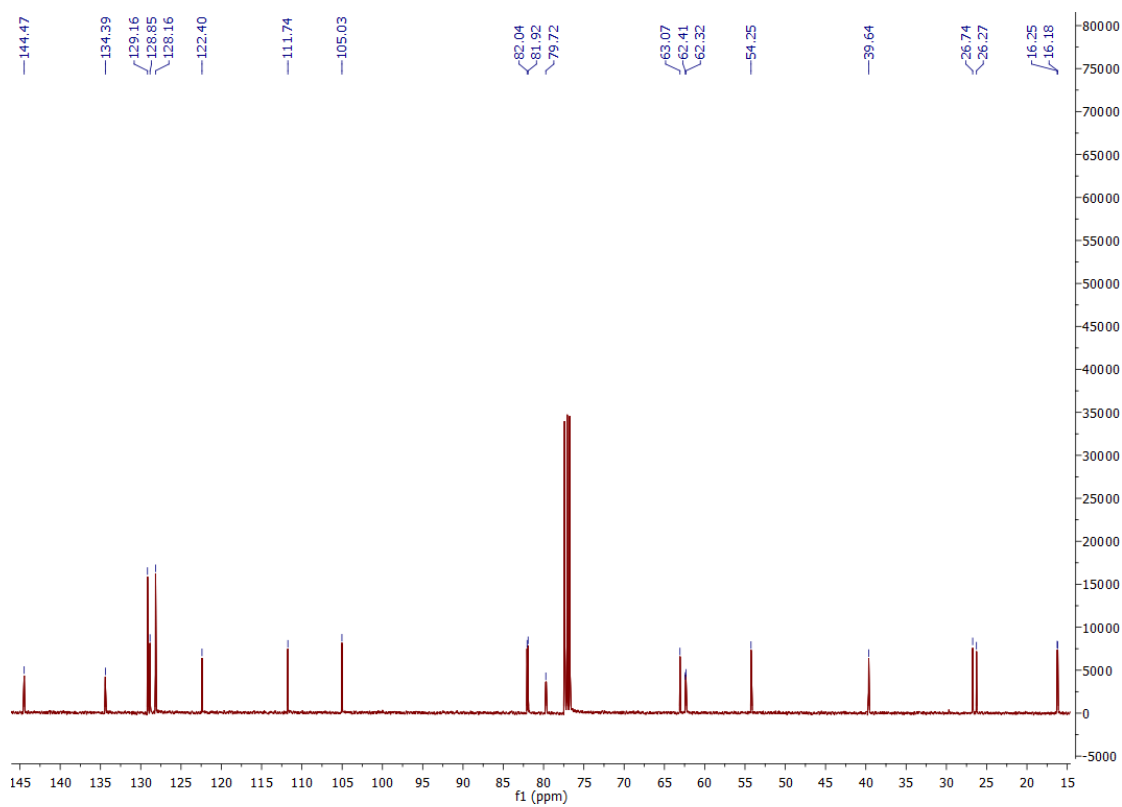
Anexo A 1.29.1. Espetro de ^1H -RMN



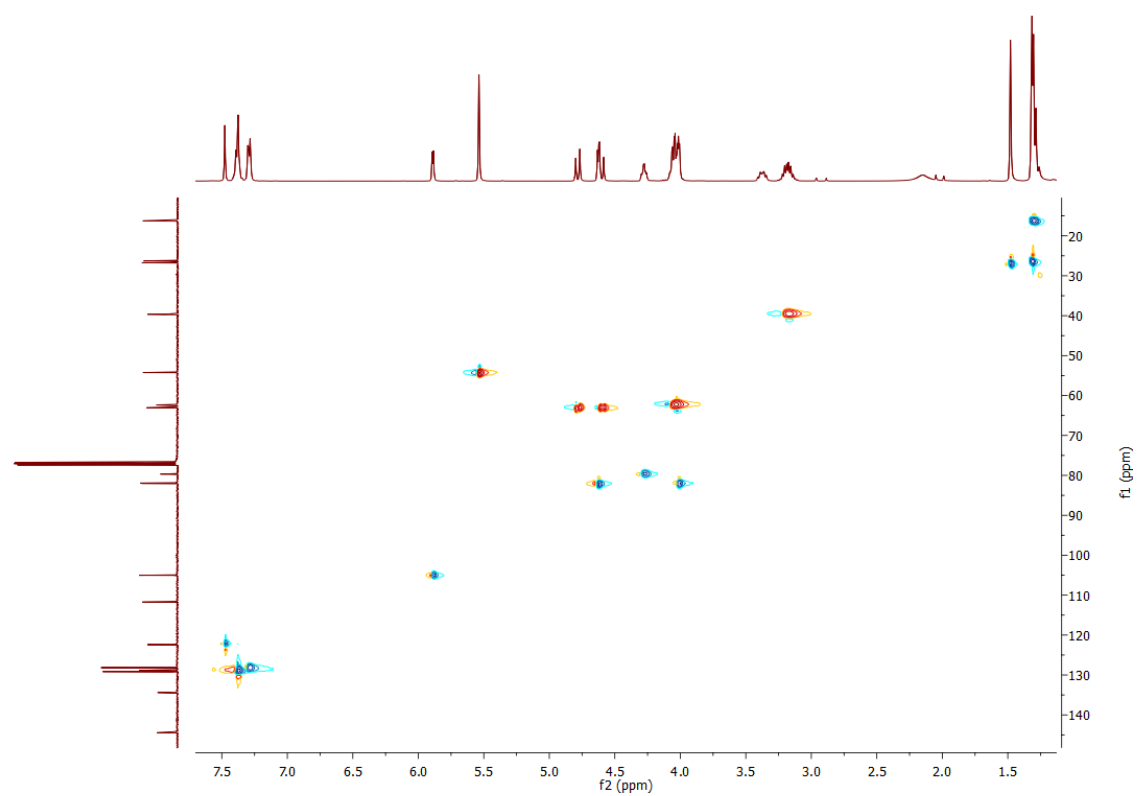
Anexo A 1.29.2. Espetro de COSY



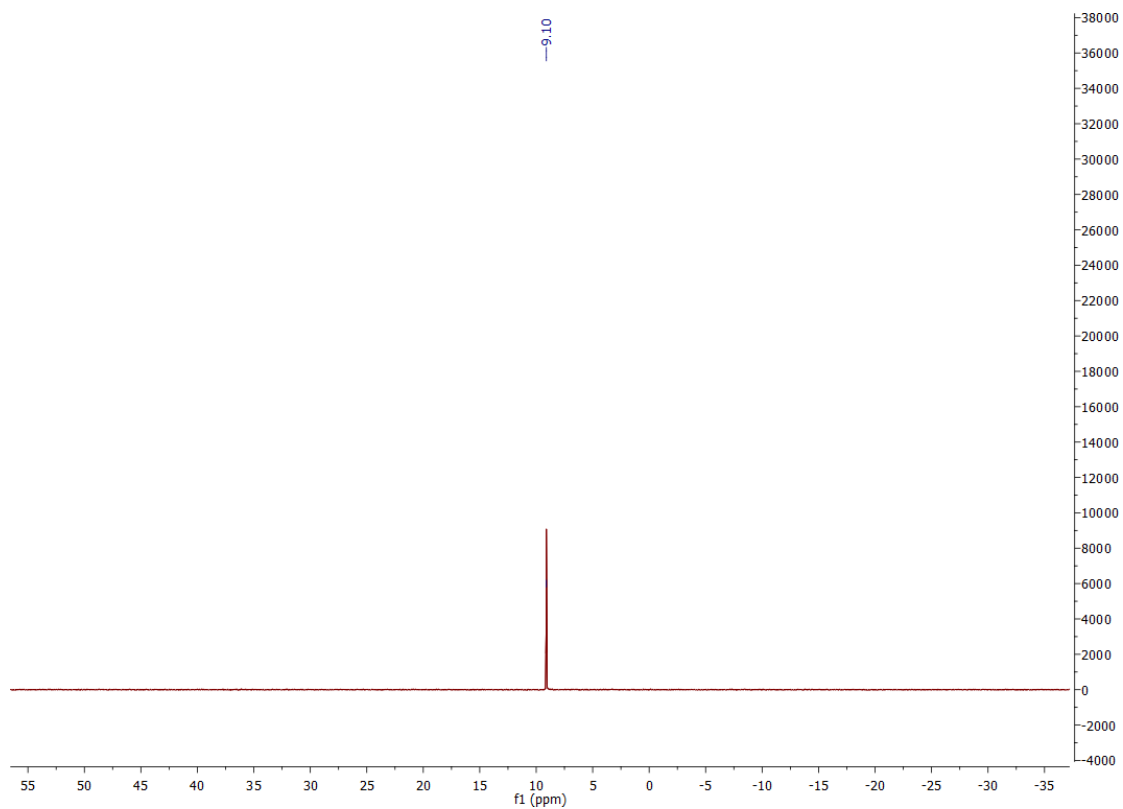
Anexo A 1.29.3. Espectro de ^{13}C -RMN



Anexo A 1.29.4. Espectro de HSQC

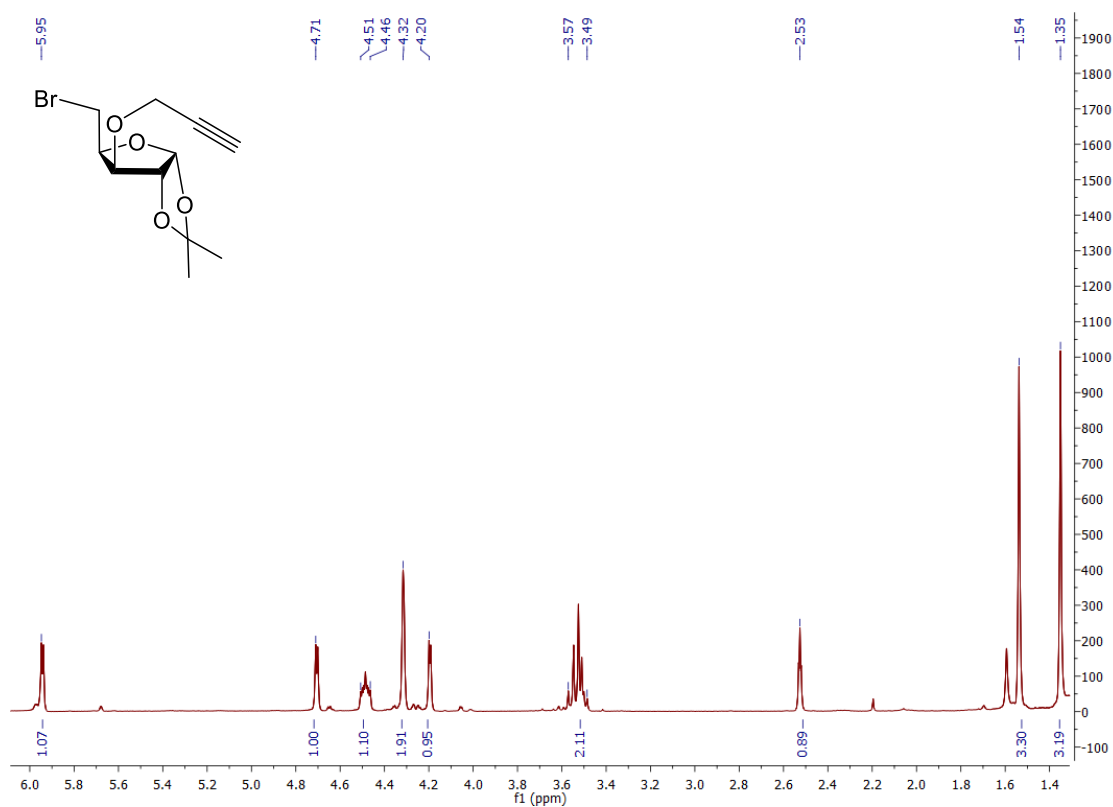


Anexo A 1.29.5. Espectro de ^{31}P -RMN

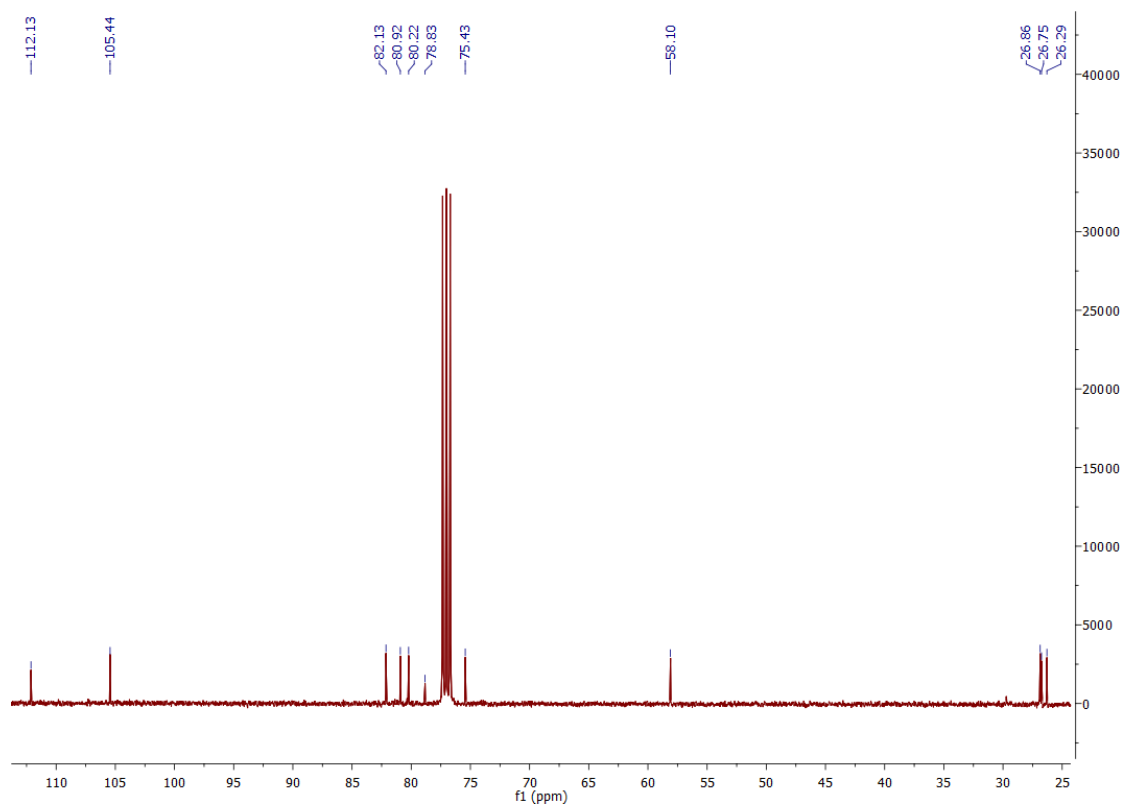


A1.30. Espectros de RMN do composto 41

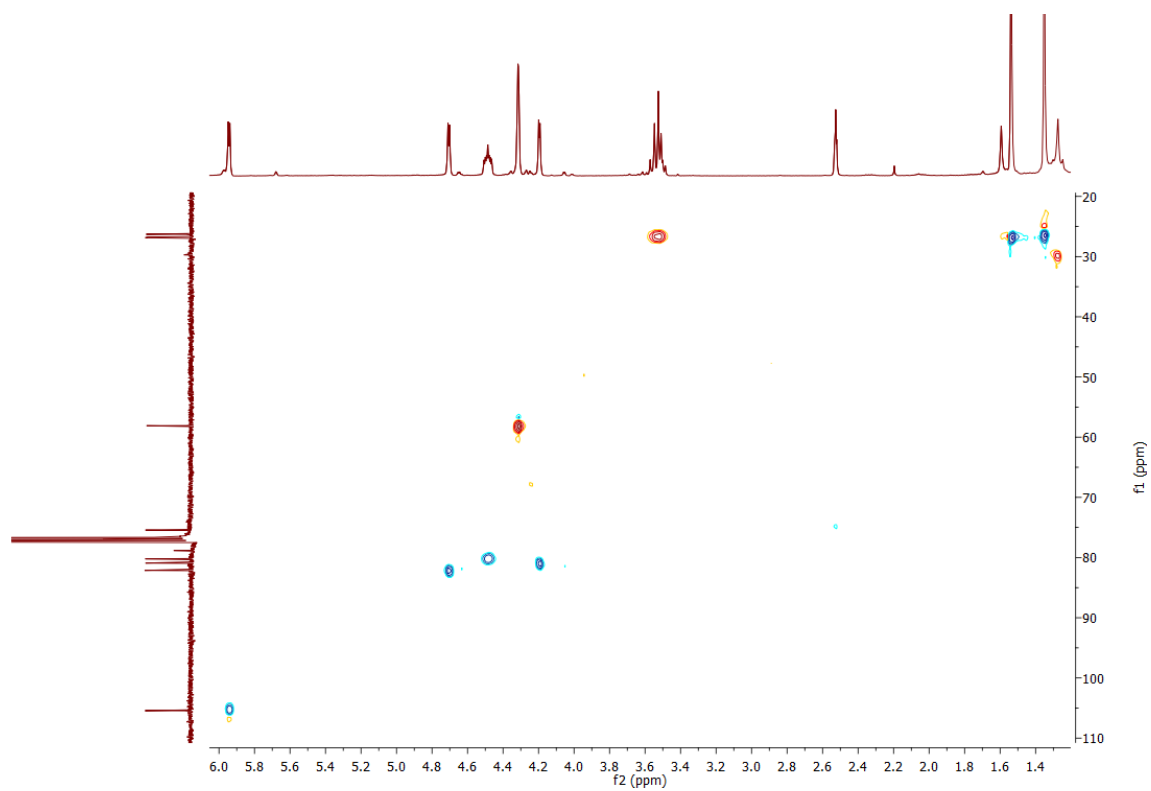
Anexo A 1.30.1. Espectro de ^1H -RMN



Anexo A 1.30.2. Espectro de ^{13}C -RMN

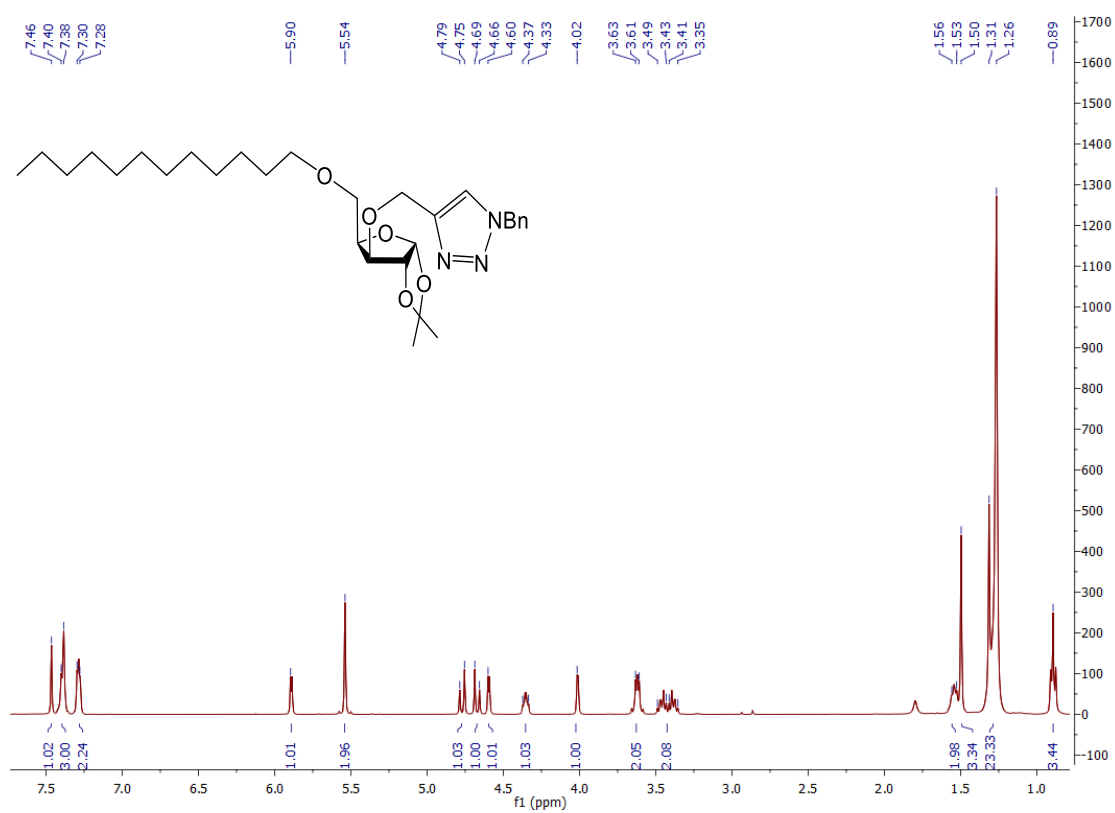


Anexo A 1.30.3. Espectro de HSQC

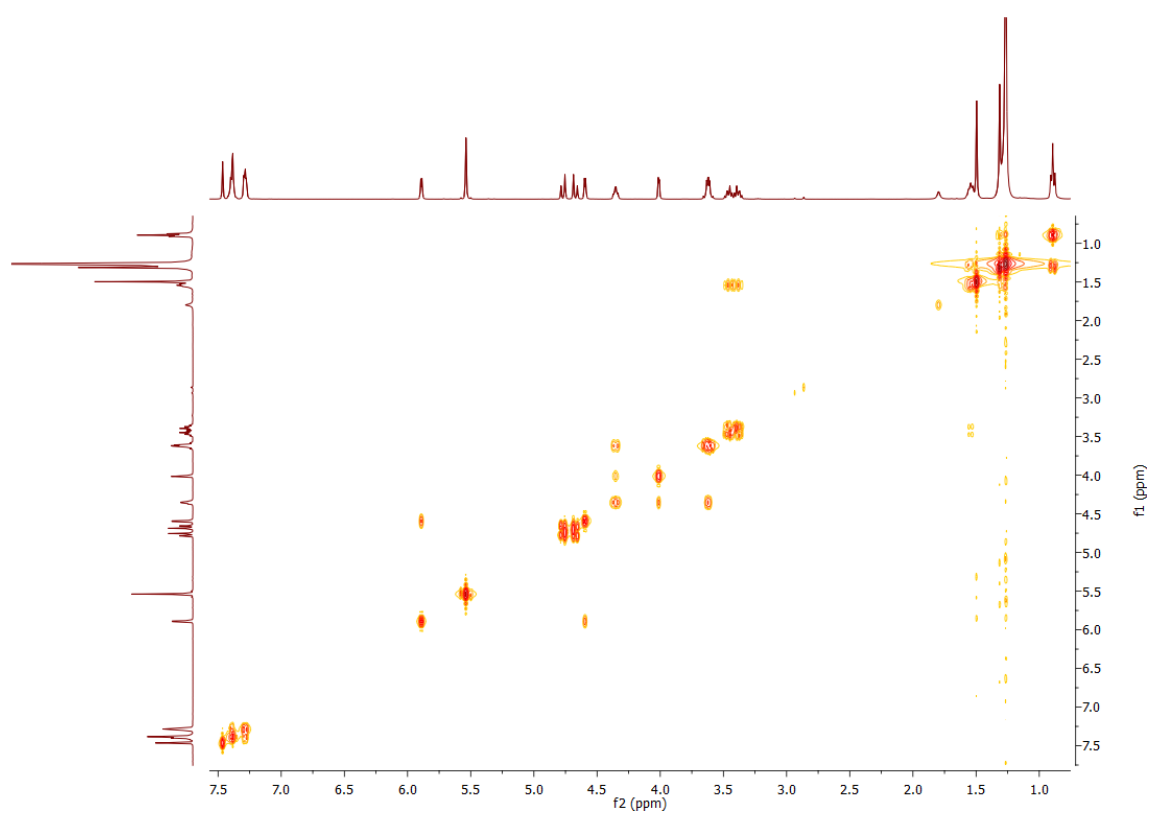


A1.31. Espetros de RMN do composto 42

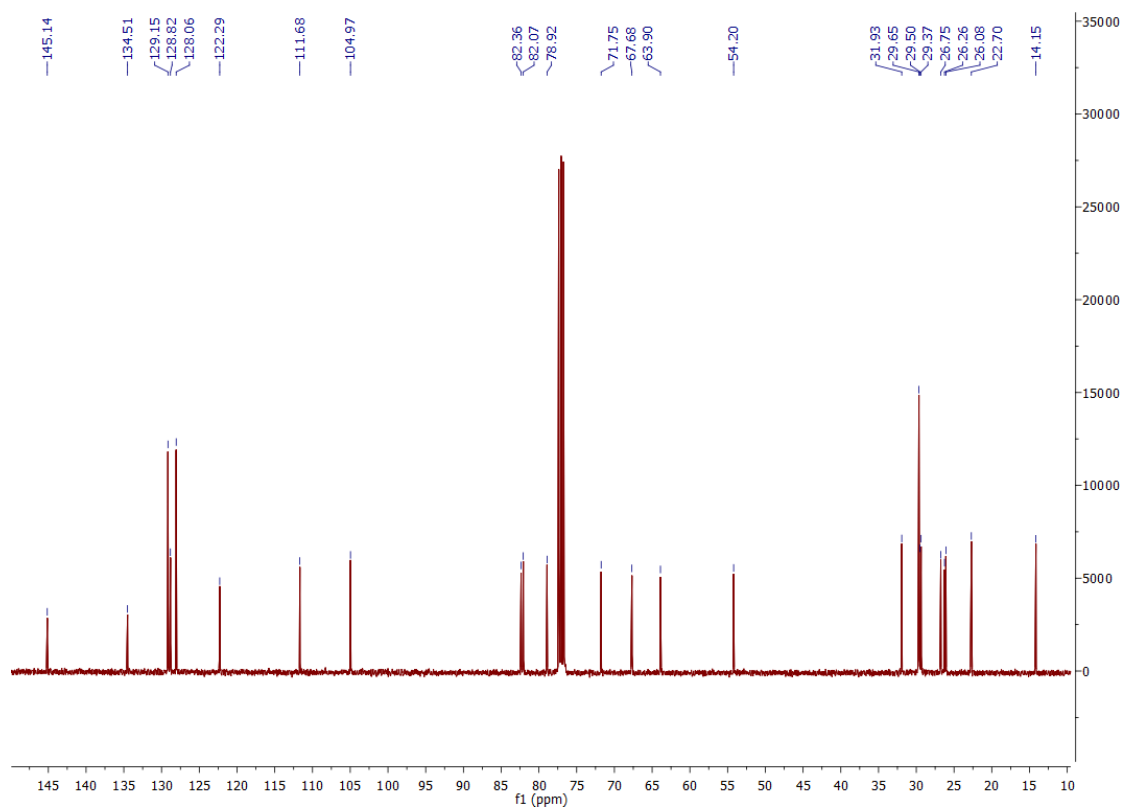
Anexo A 1.31.1. Espectro de ^1H -RMN



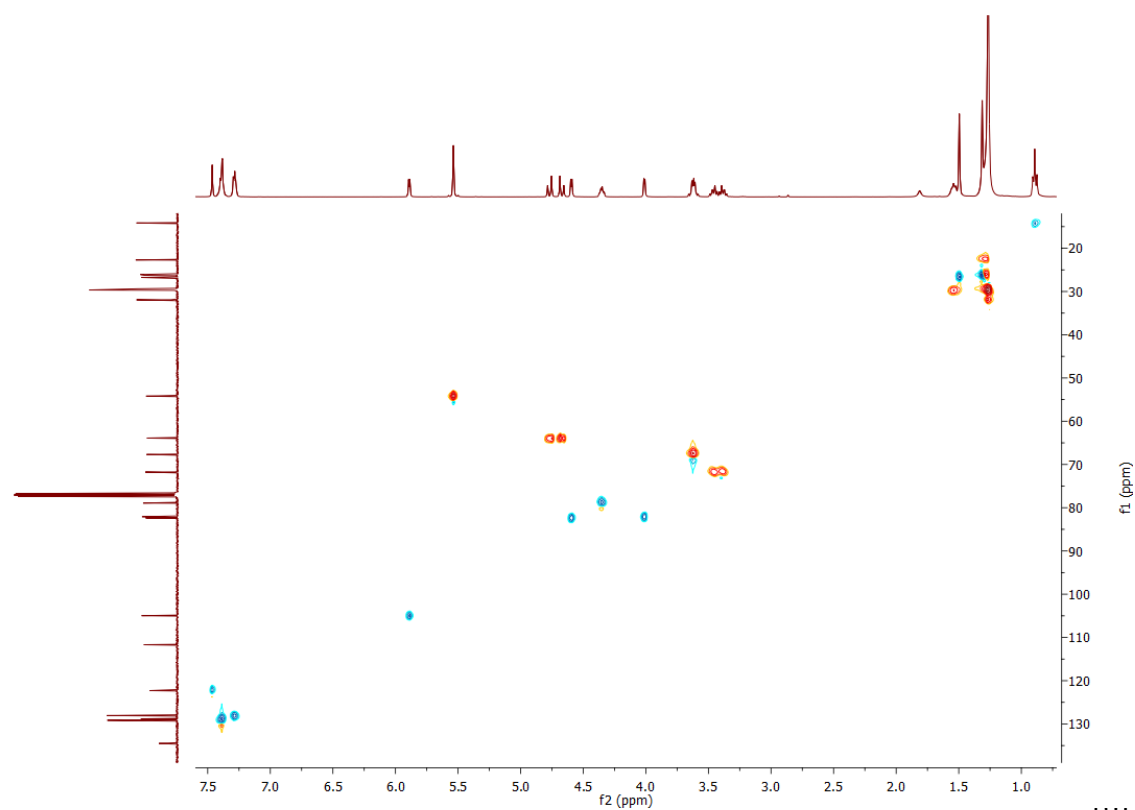
Anexo A 1.31.2. Espectro de COSY



Anexo A 1.31.3. Espectro de ^{13}C -RMN

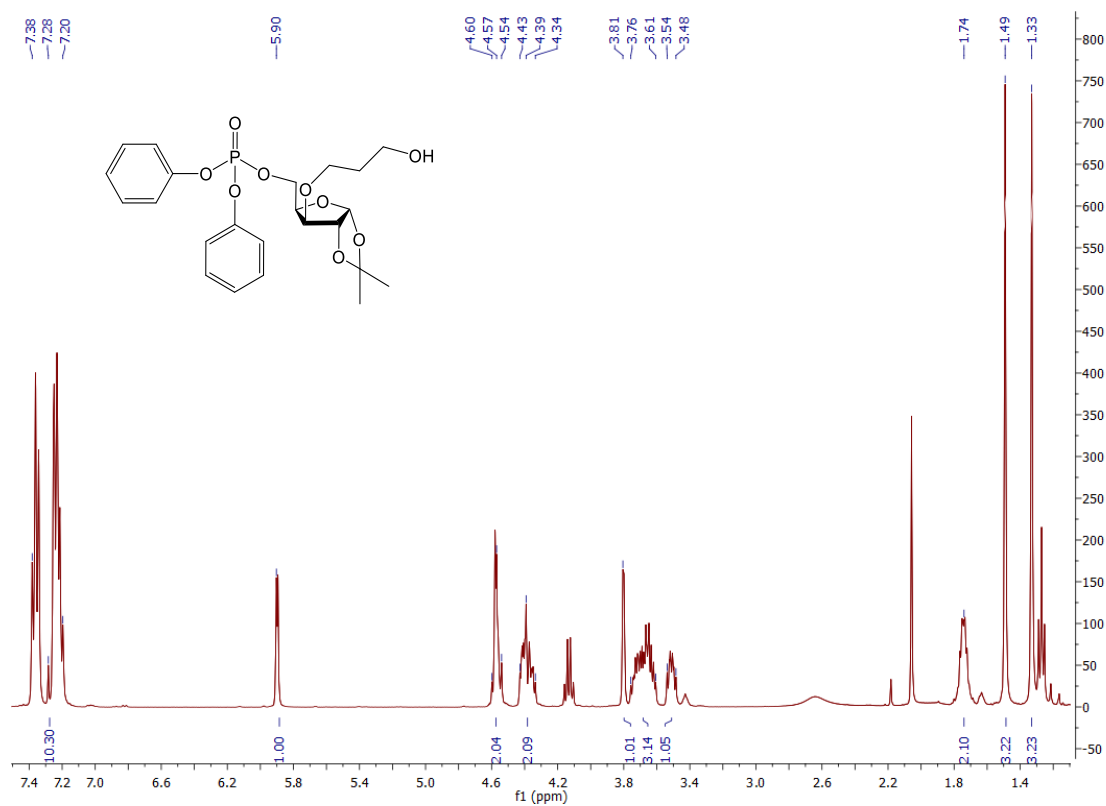


Anexo A 1.31.4. Espectro de HSQC

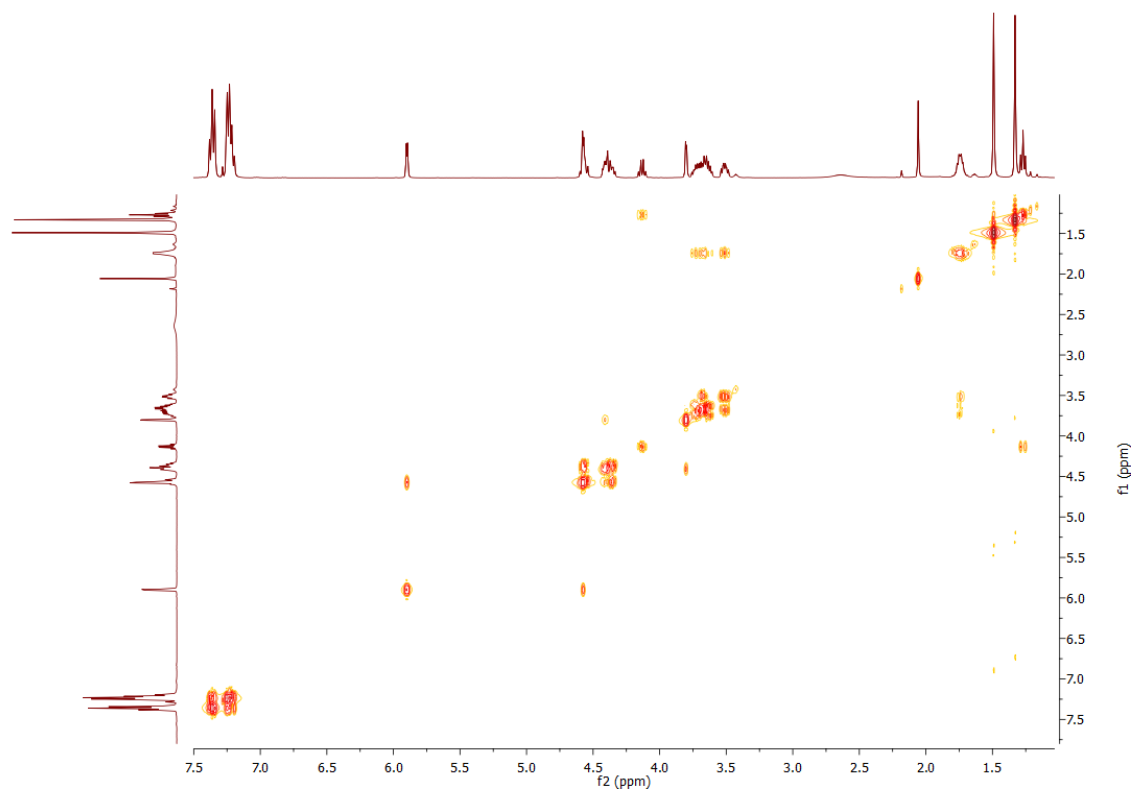


A1.32. Espetros de RMN do composto 43

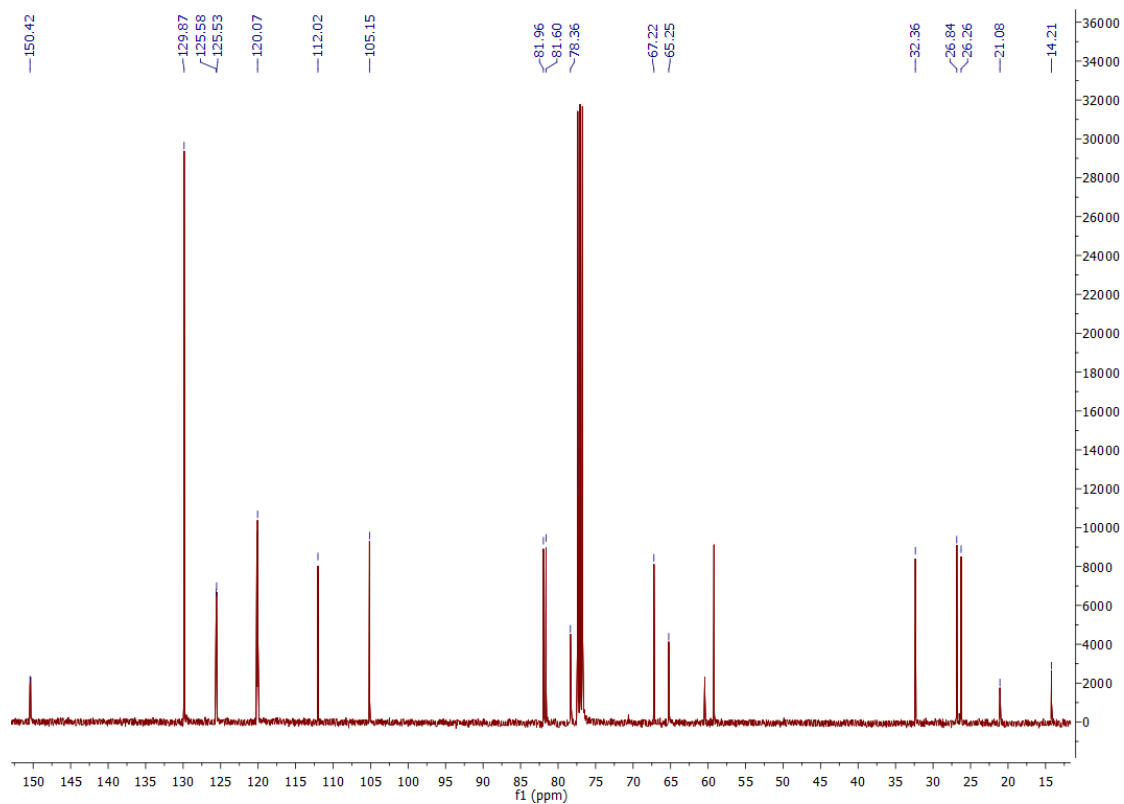
Anexo A 1.32.1. Espectro de ^1H -RMN



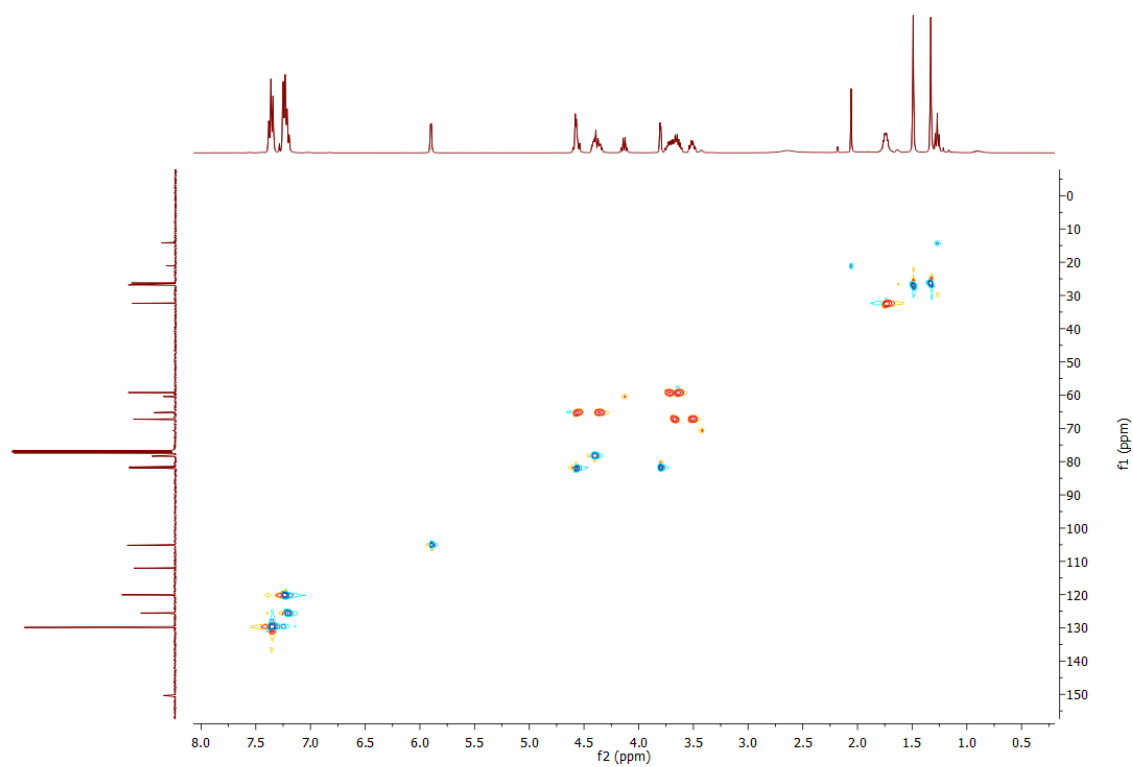
Anexo A 1.32.2. Espectro de COSY



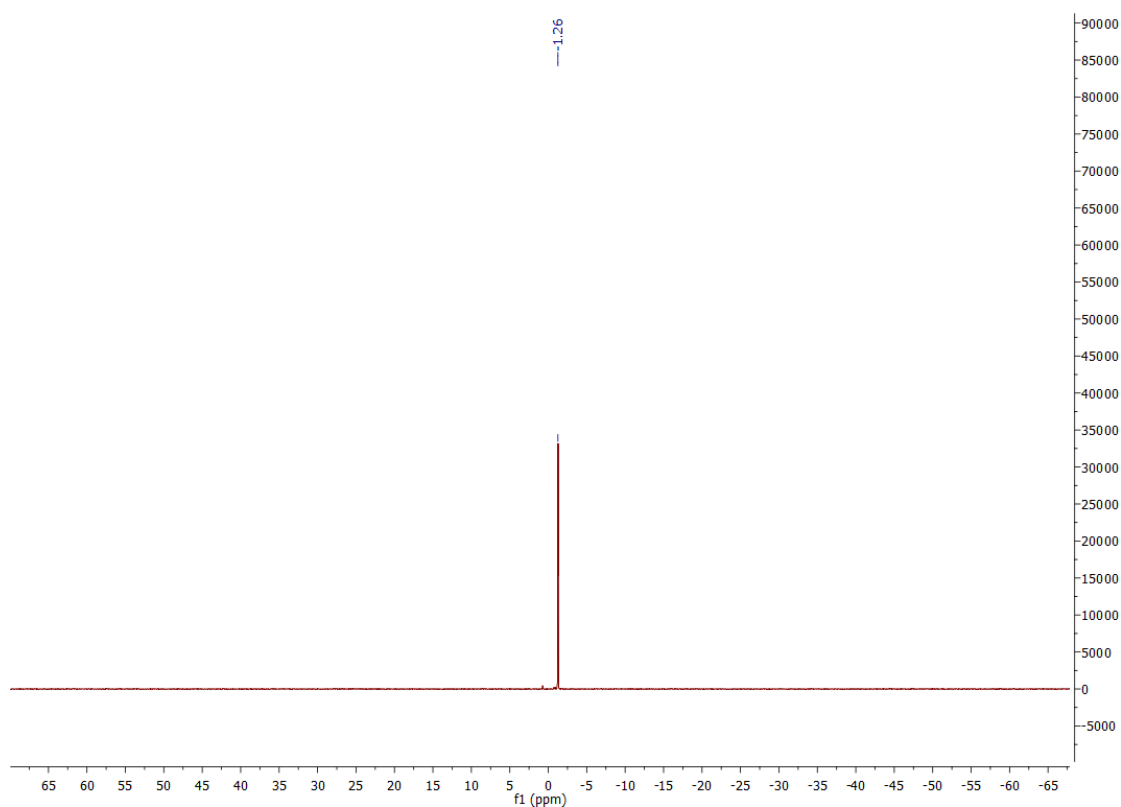
Anexo A 1.32.3. Espectro de ^{13}C -RMN



Anexo A 1.32.4. Espectro de HSQC

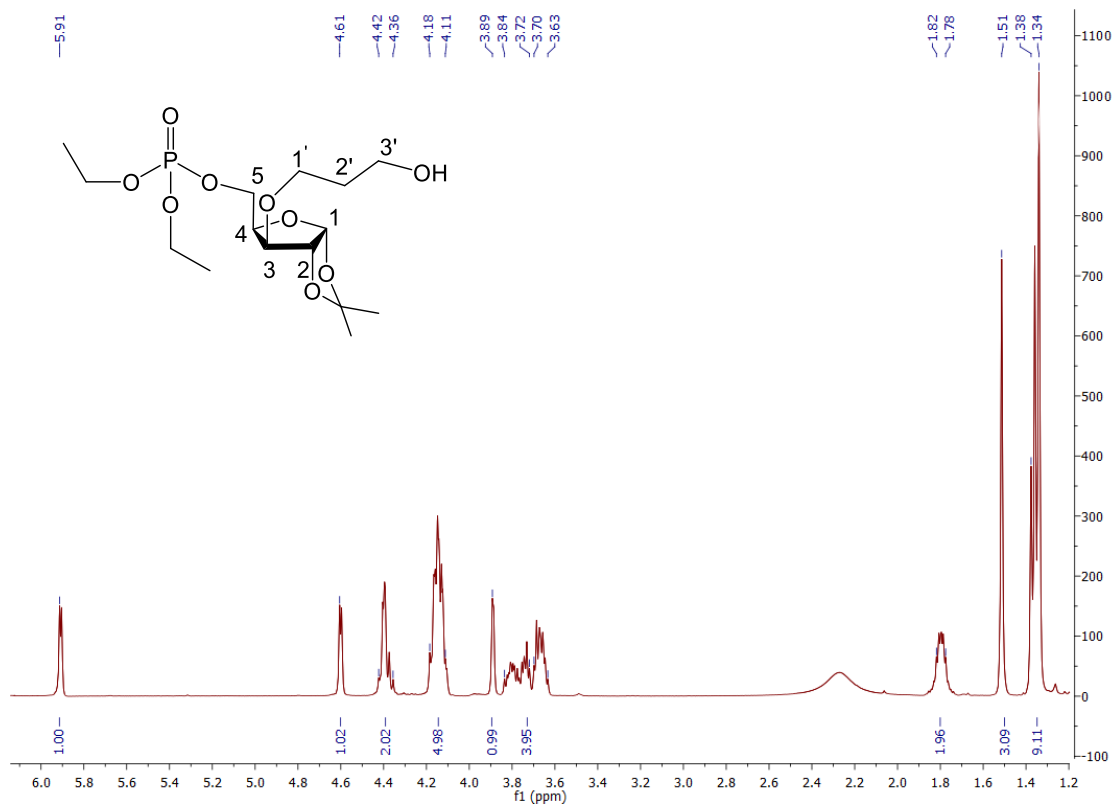


Anexo A 1.32.5. Espectro de ^{31}P -RMN

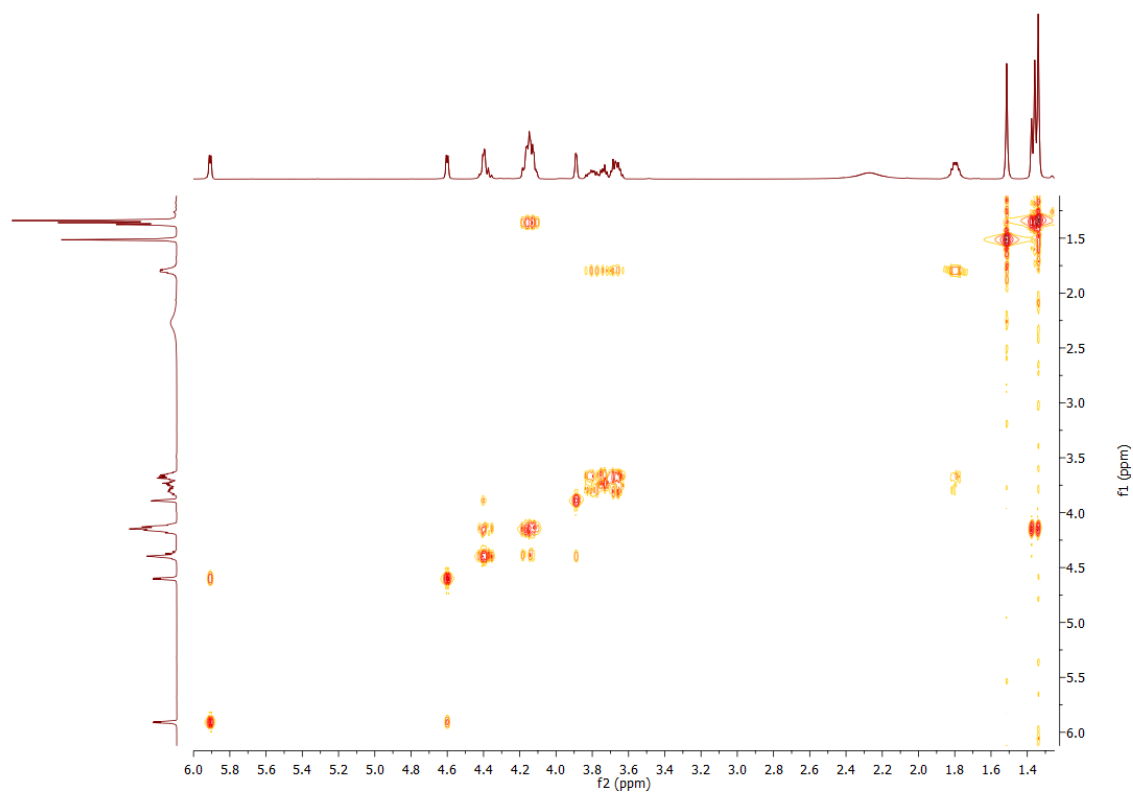


A1.33. Espectros de RMN do composto 44

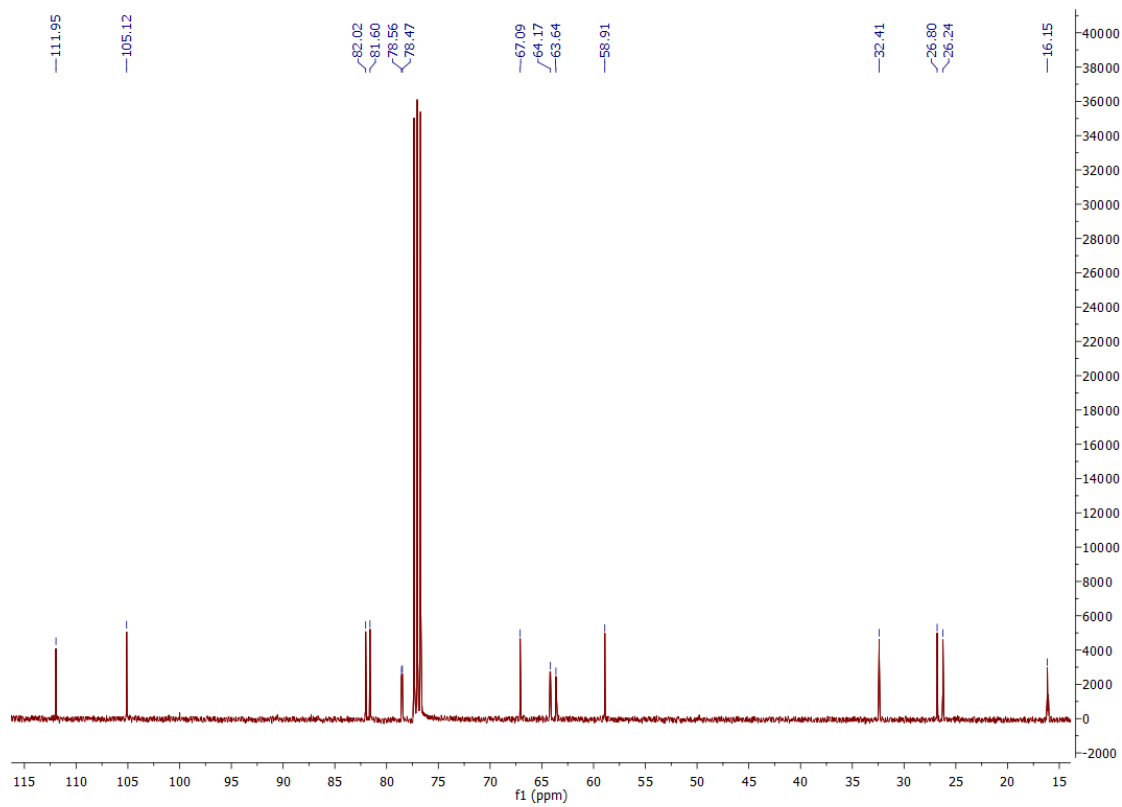
Anexo A 1.33.1. Espectro de ^1H -RMN



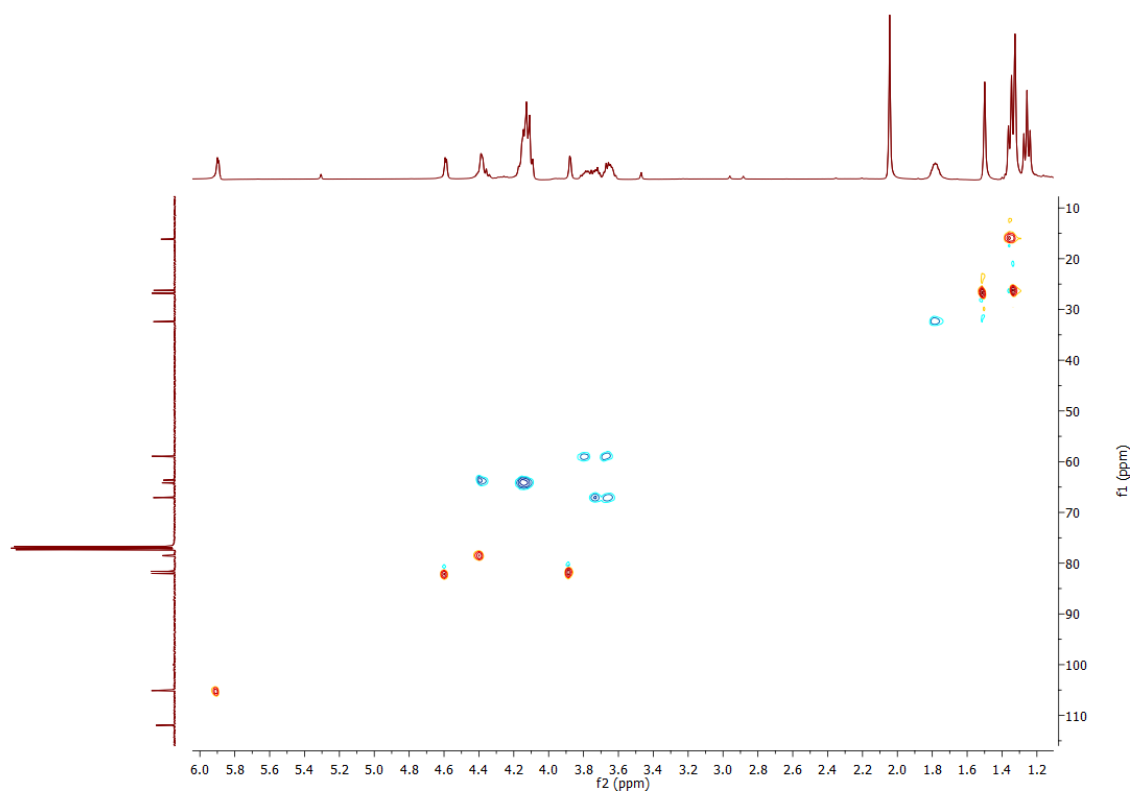
Anexo A 1.33.2. Espectro de COSY



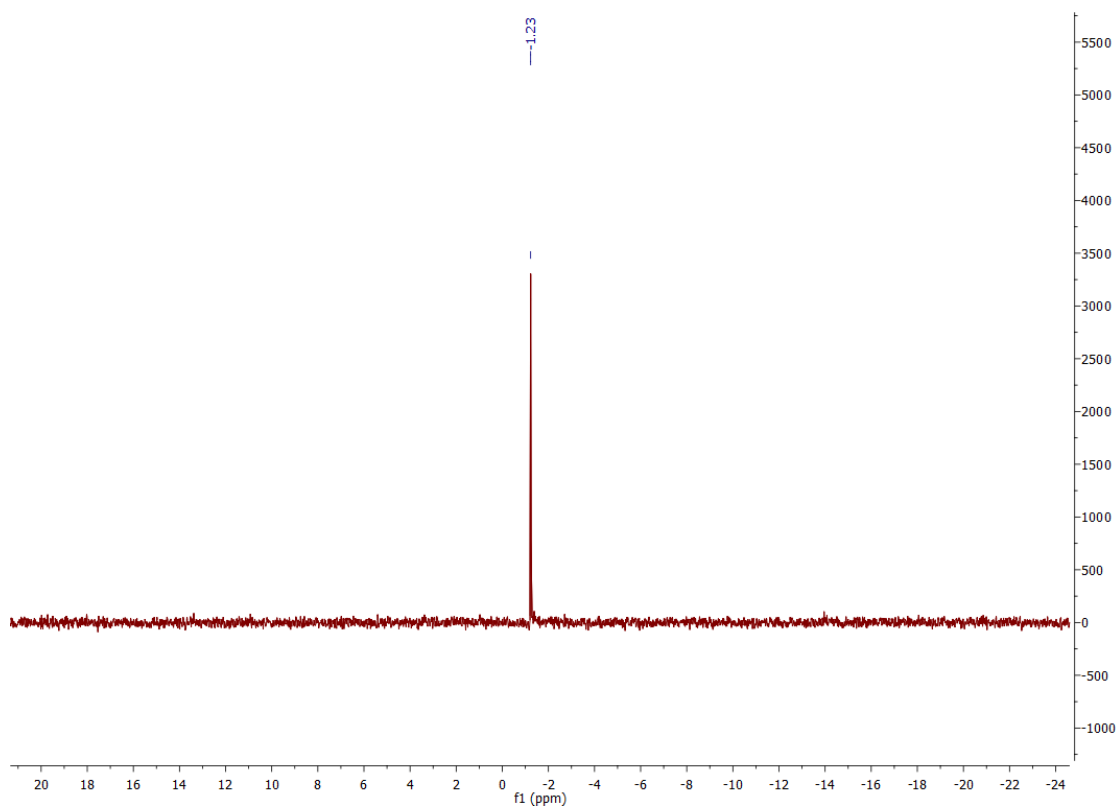
Anexo A 1.33.3. Espectro de ^{13}C -RMN



Anexo A 1.33.4. Espectro de HSQC

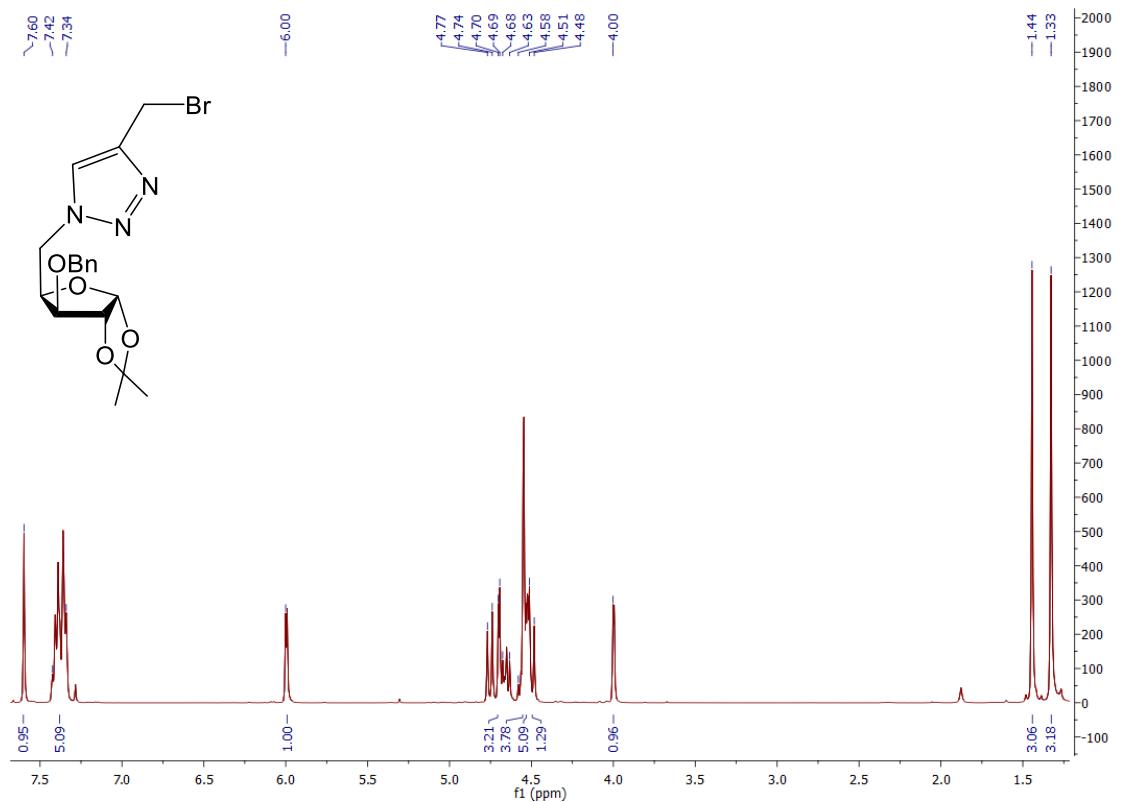


Anexo A 1.33.5. Espectro de ^{31}P -RMN

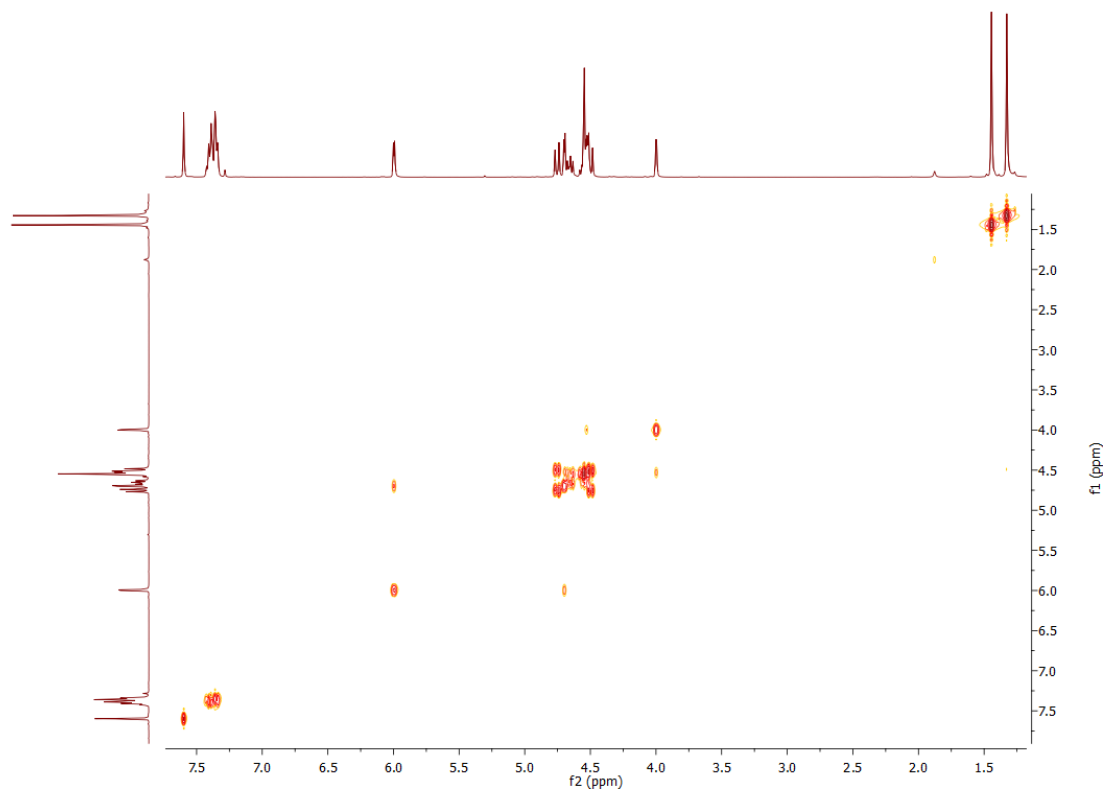


A1.34. Espectros de RMN do composto 45

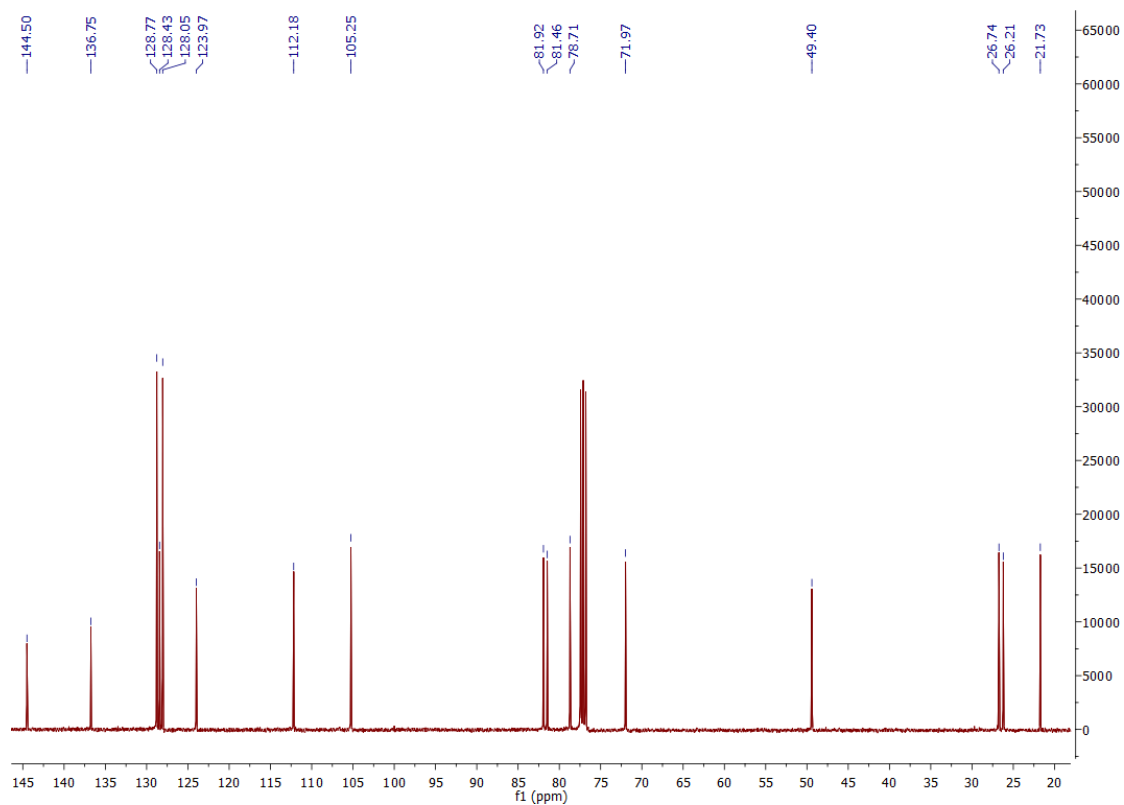
Anexo A 1.34.1. Espectro de ^1H -RMN



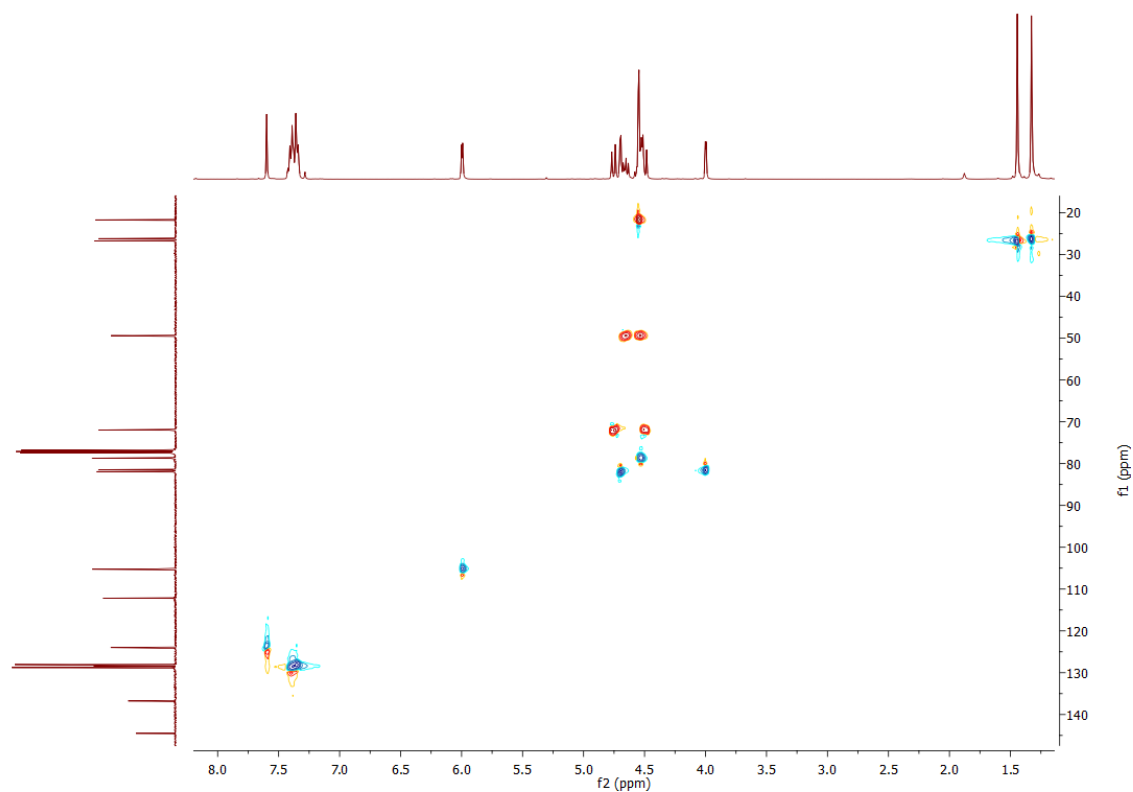
Anexo A 1.34.2. Espectro de COSY



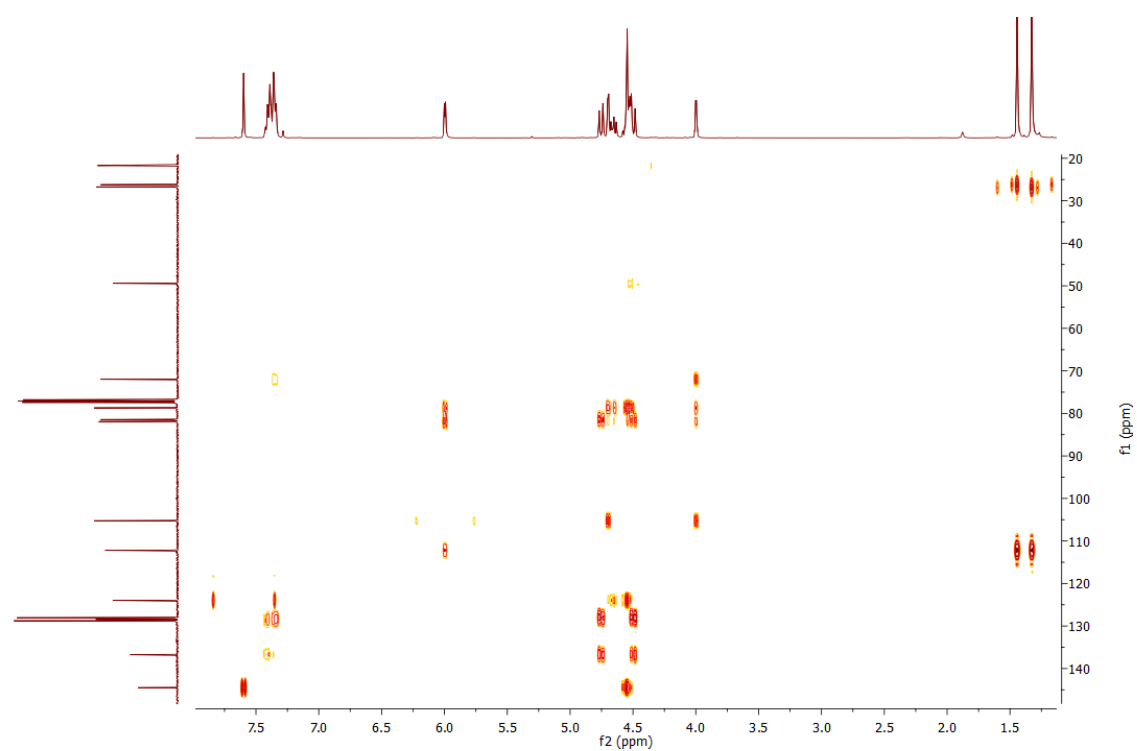
Anexo A 1.34.3. Espectro de ^{13}C -RMN



Anexo A 1.34.4. Espectro de HSQC

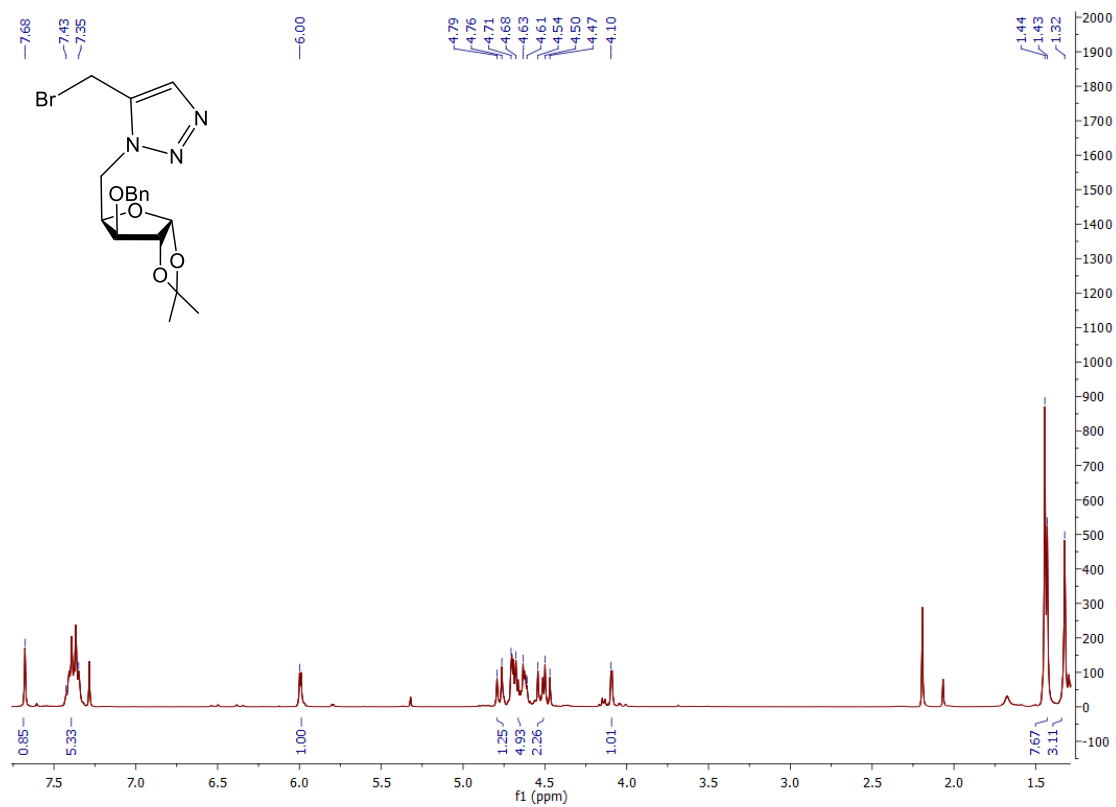


Anexo A 1.34.5. Espectro de HMBC

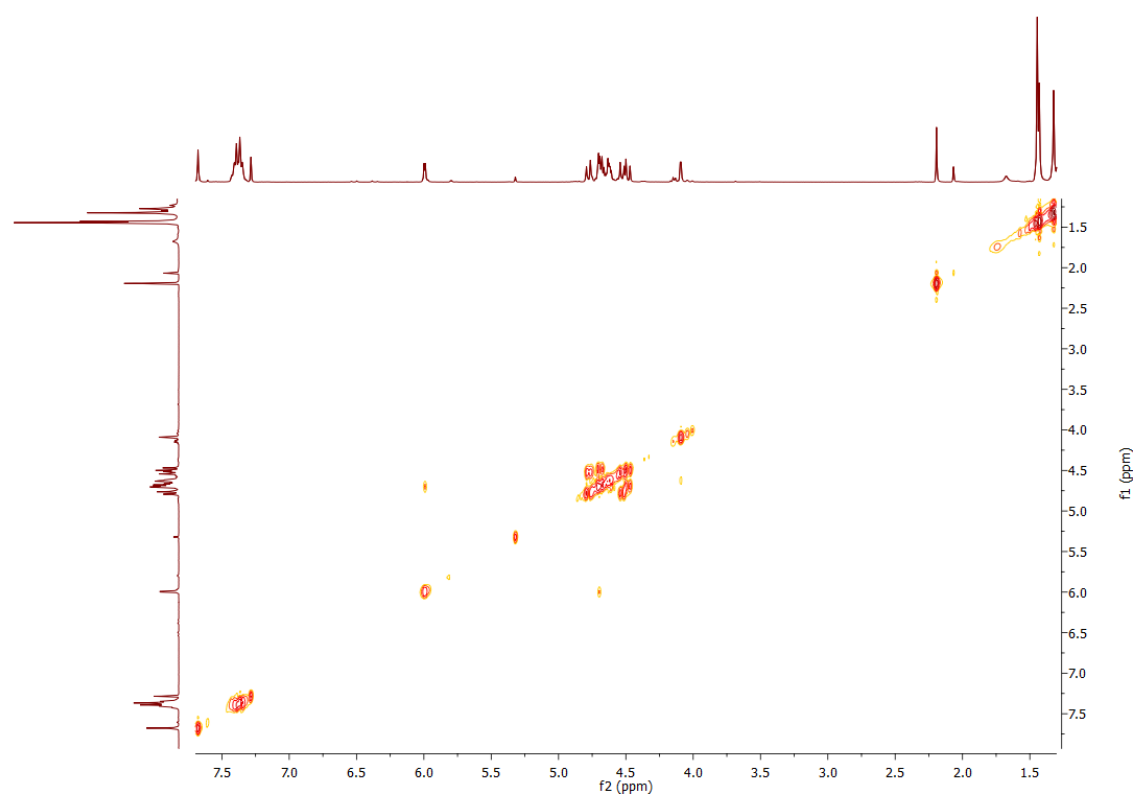


A1.35. Espectros de RMN do composto 46

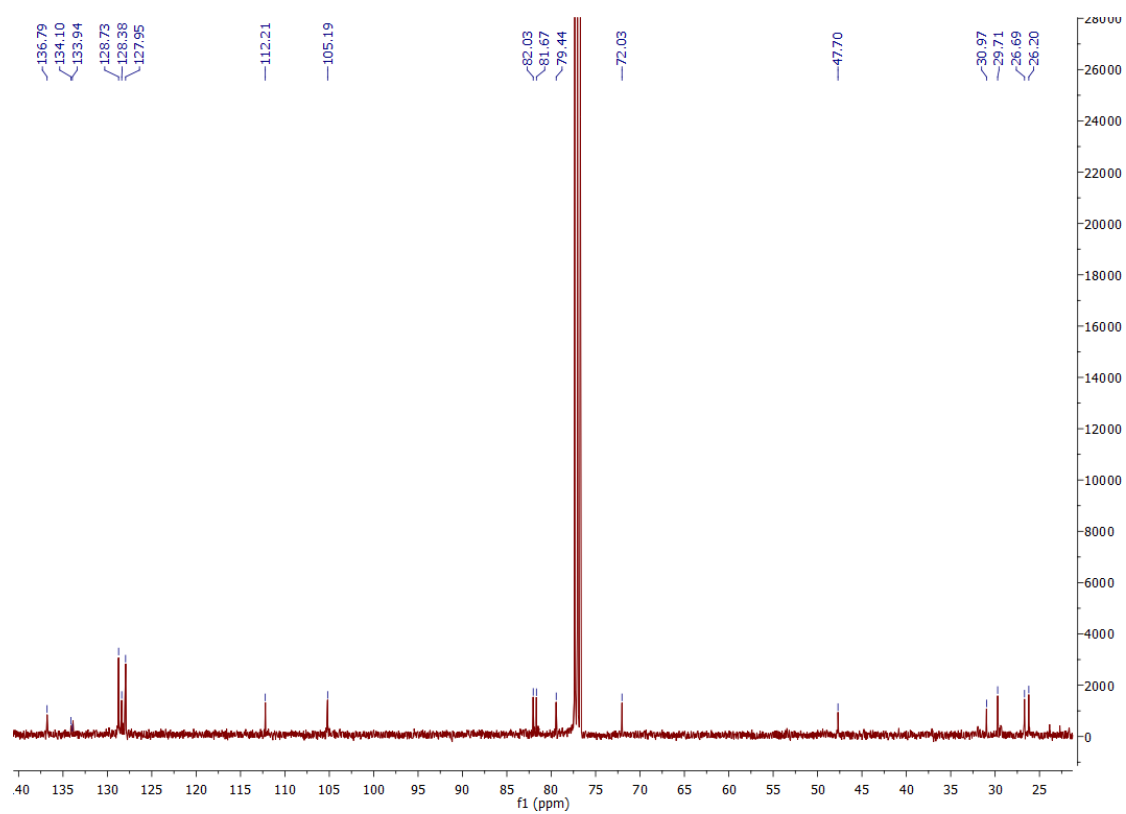
Anexo A 1.35.1. Espectro de ^1H -RMN



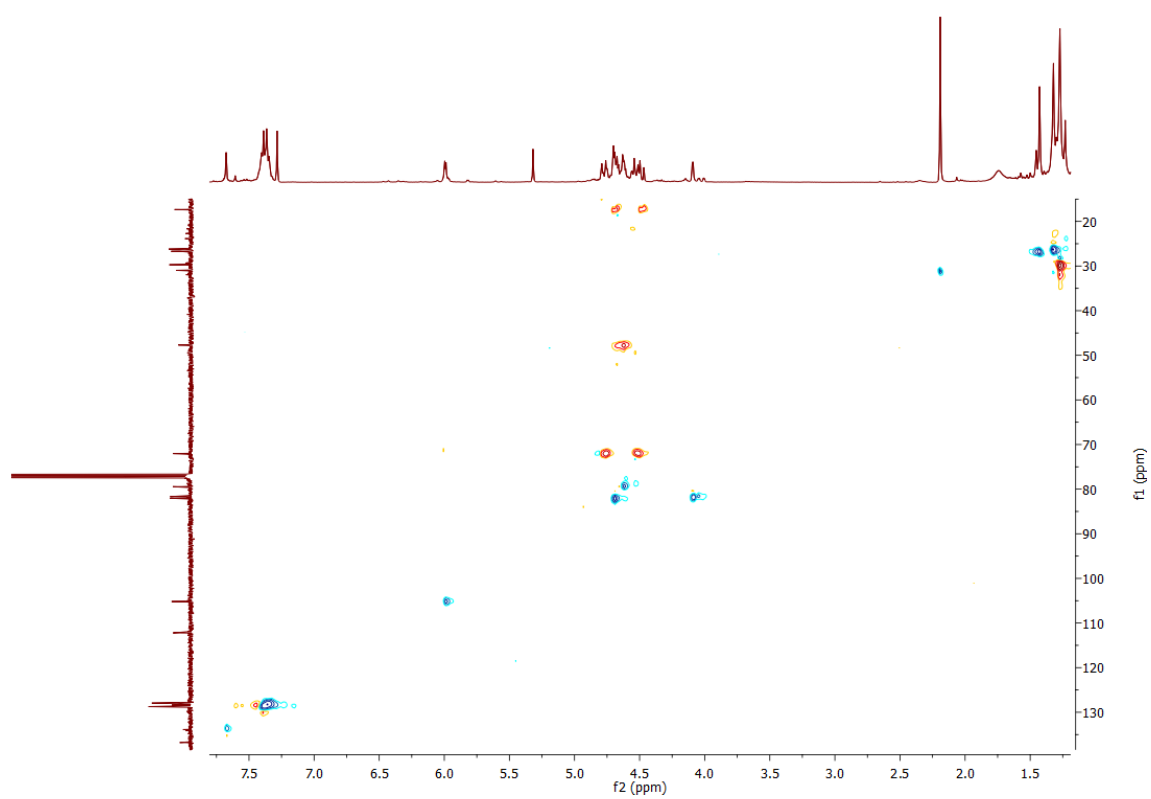
Anexo A 1.35.2. Espectro de COSY



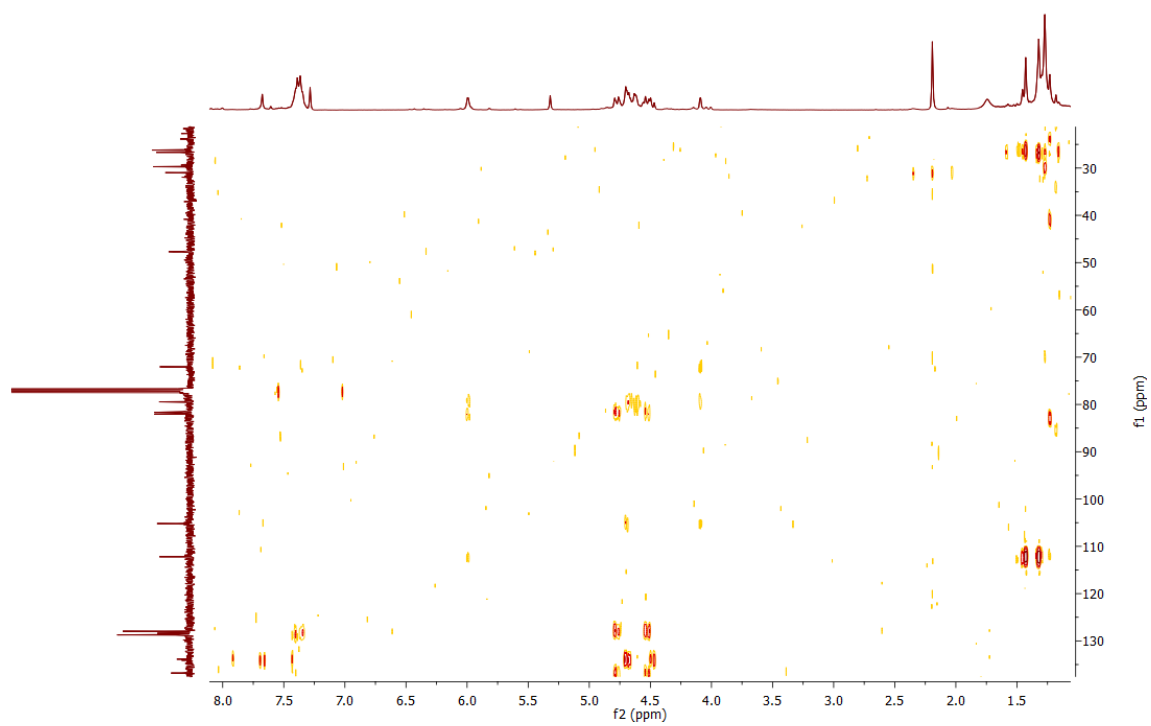
Anexo A 1.35.3. Espectro de ^{13}C -RMN



Anexo A 1.35.4. Espectro de HSQC

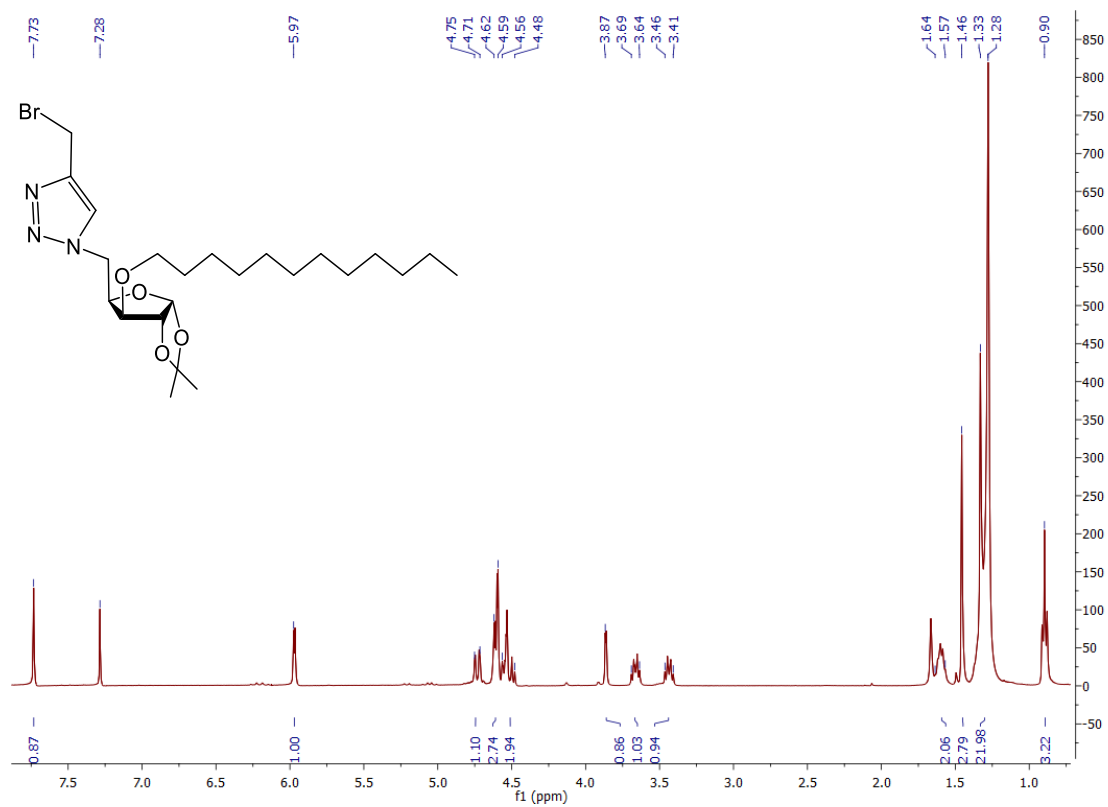


Anexo A 1.35.5. Espectro de HMBC

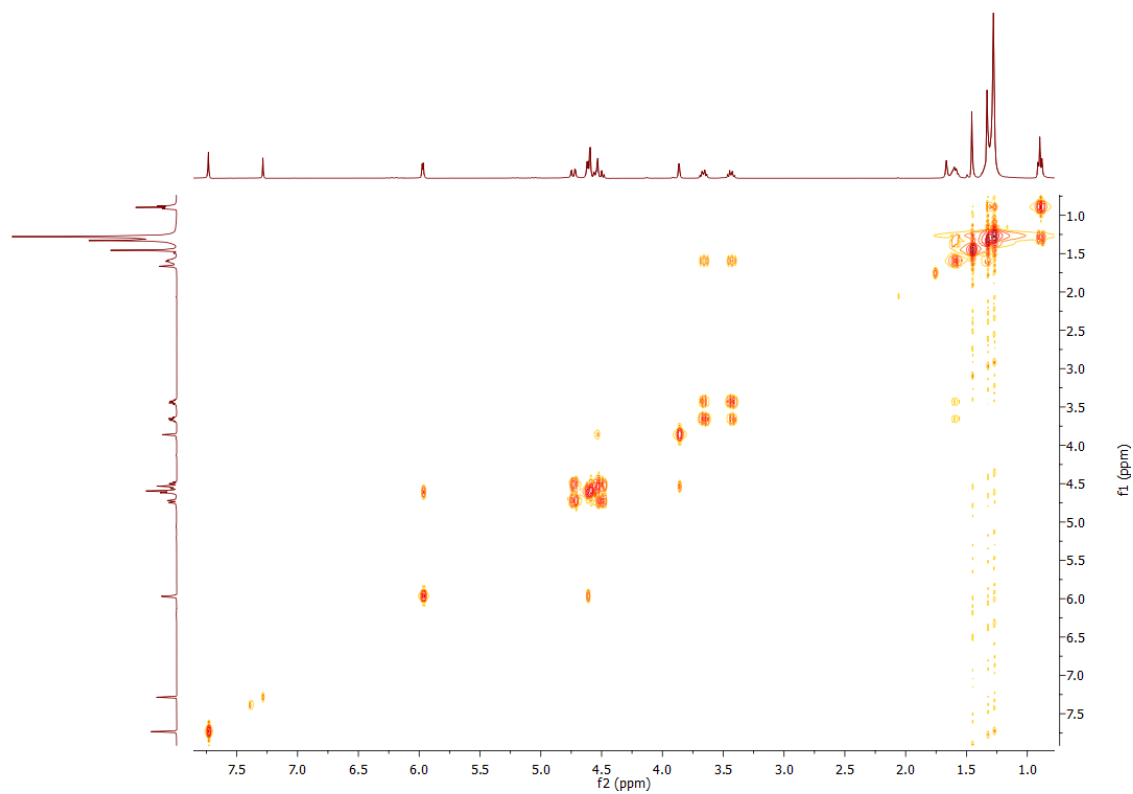


A1.36. Espetros de RMN do composto 47

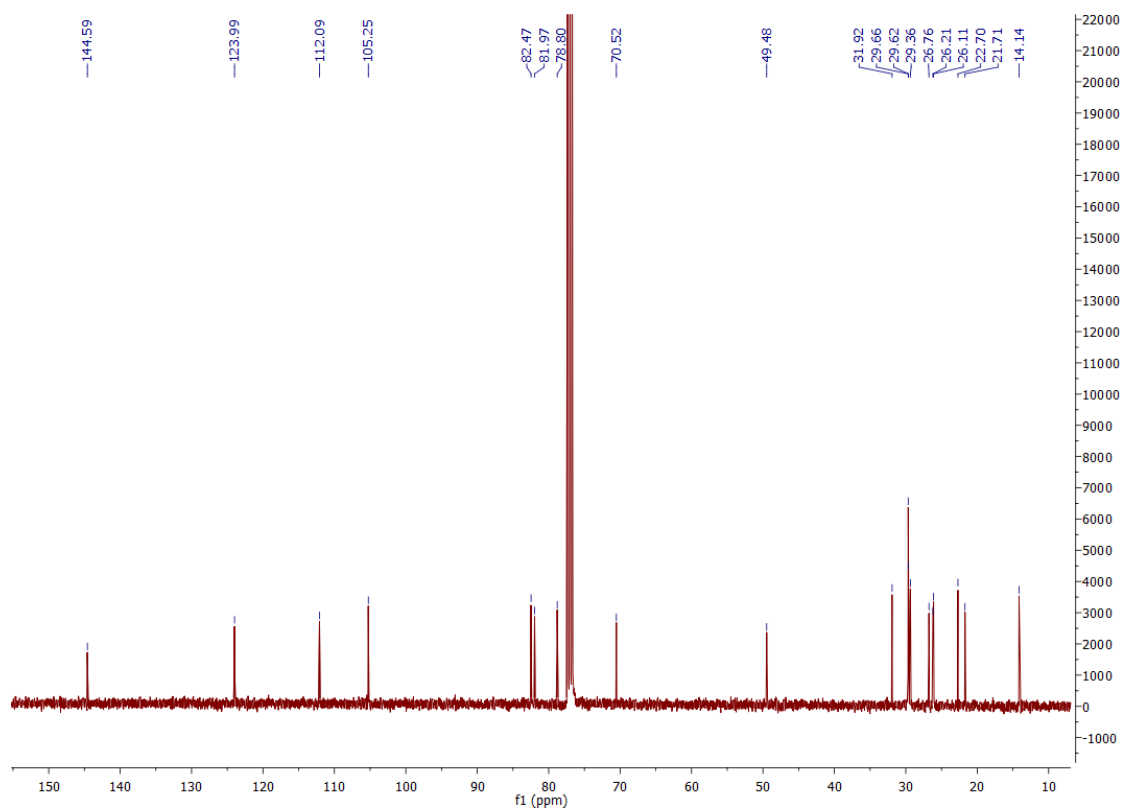
Anexo A 1.36.1. Espectro de ^1H -RMN



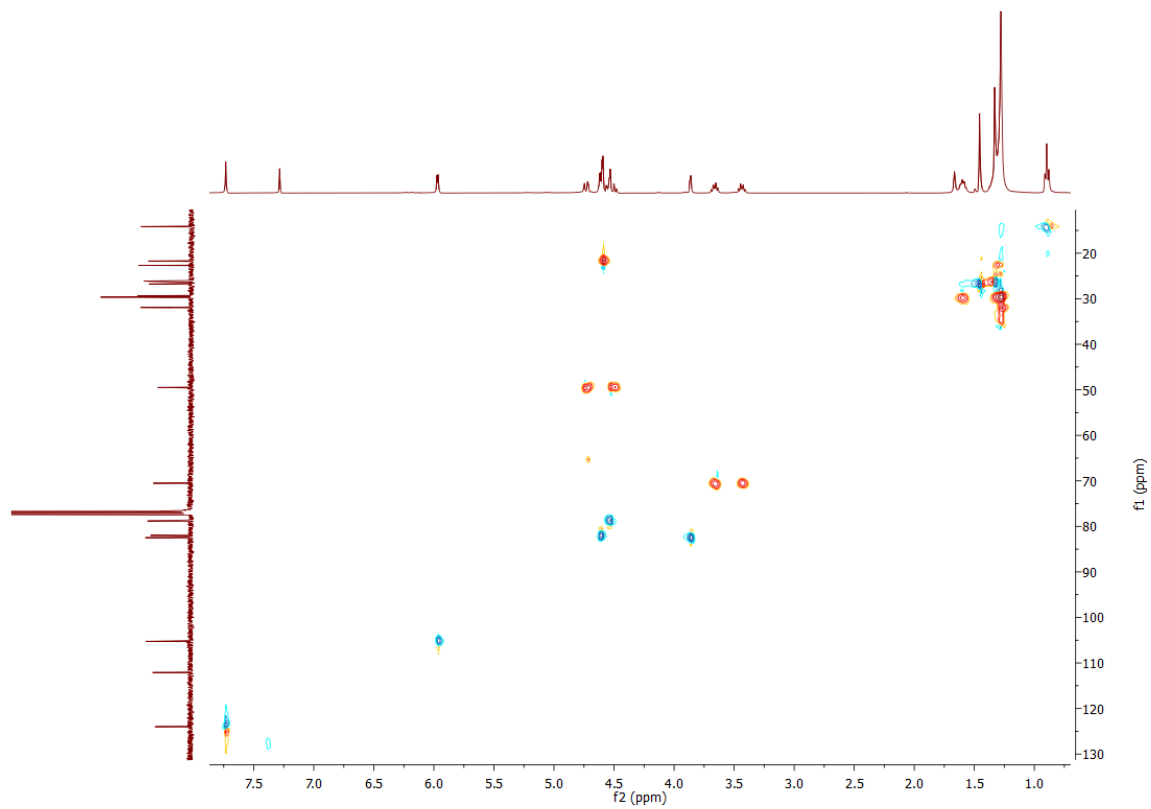
Anexo A 1.36.2. Espectro de COSY



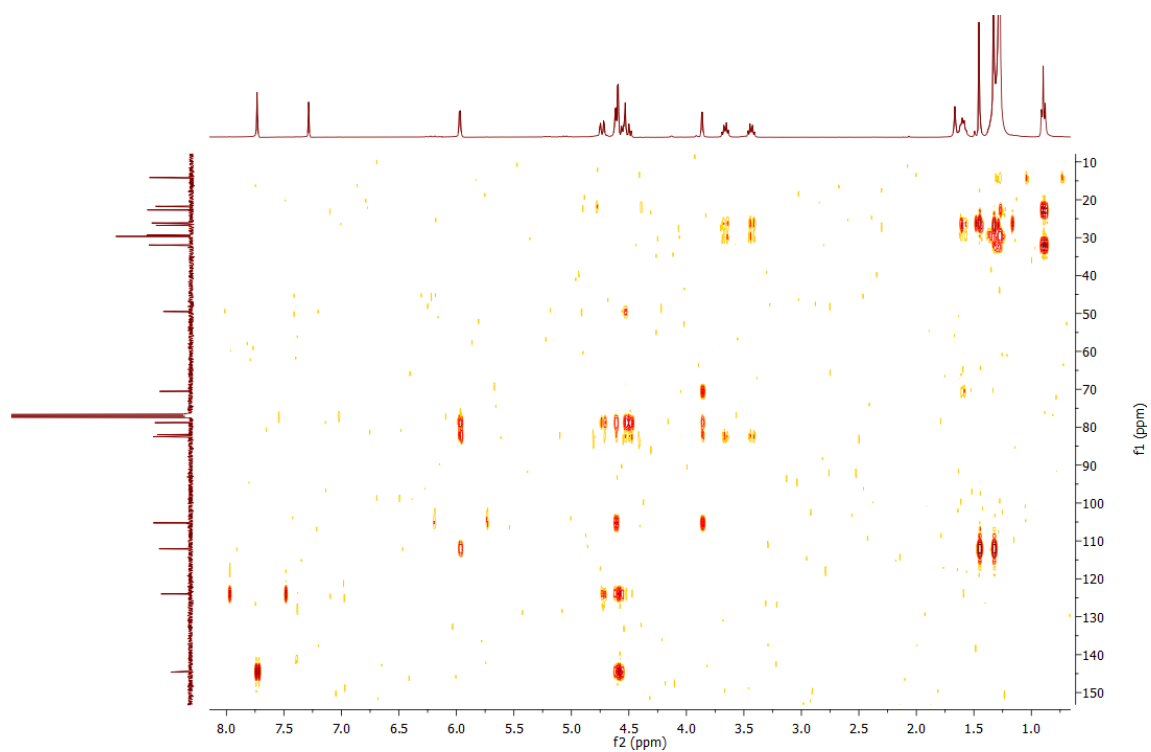
Anexo A 1.36.3. Espectro de ^{13}C -RMN



Anexo A 1.36.4. Espectro de HSQC

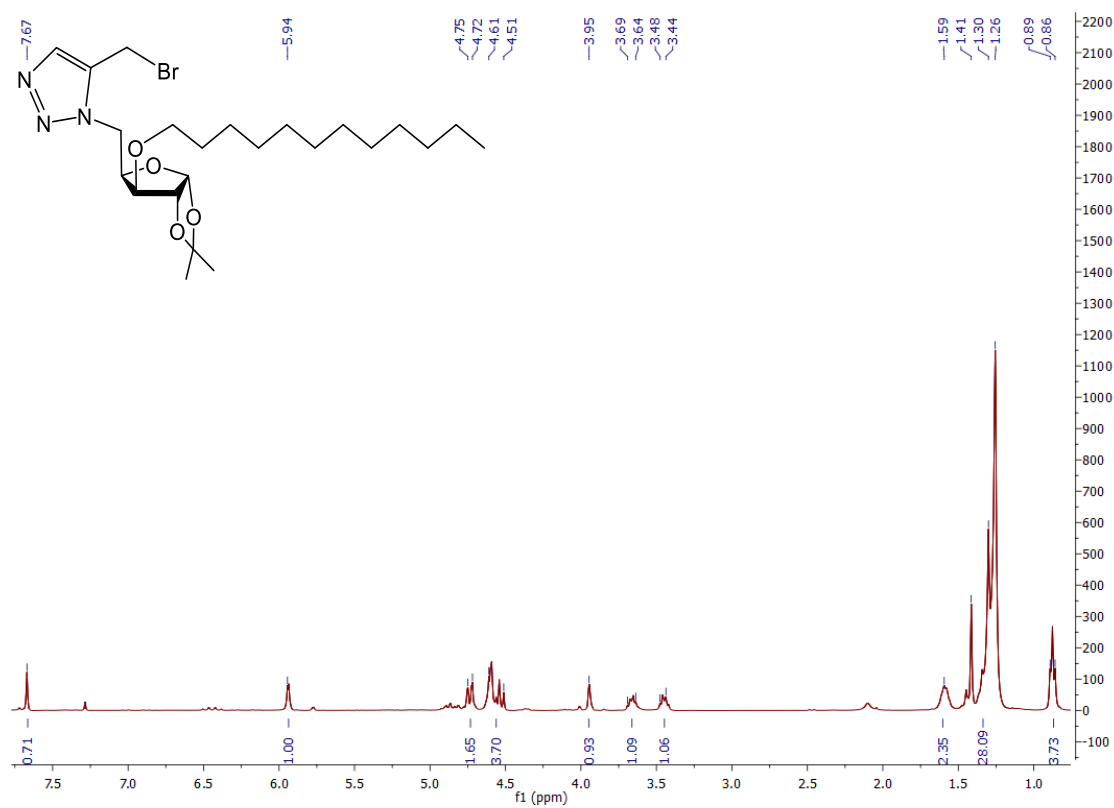


Anexo A 1.36.5. Espectro de HMBC

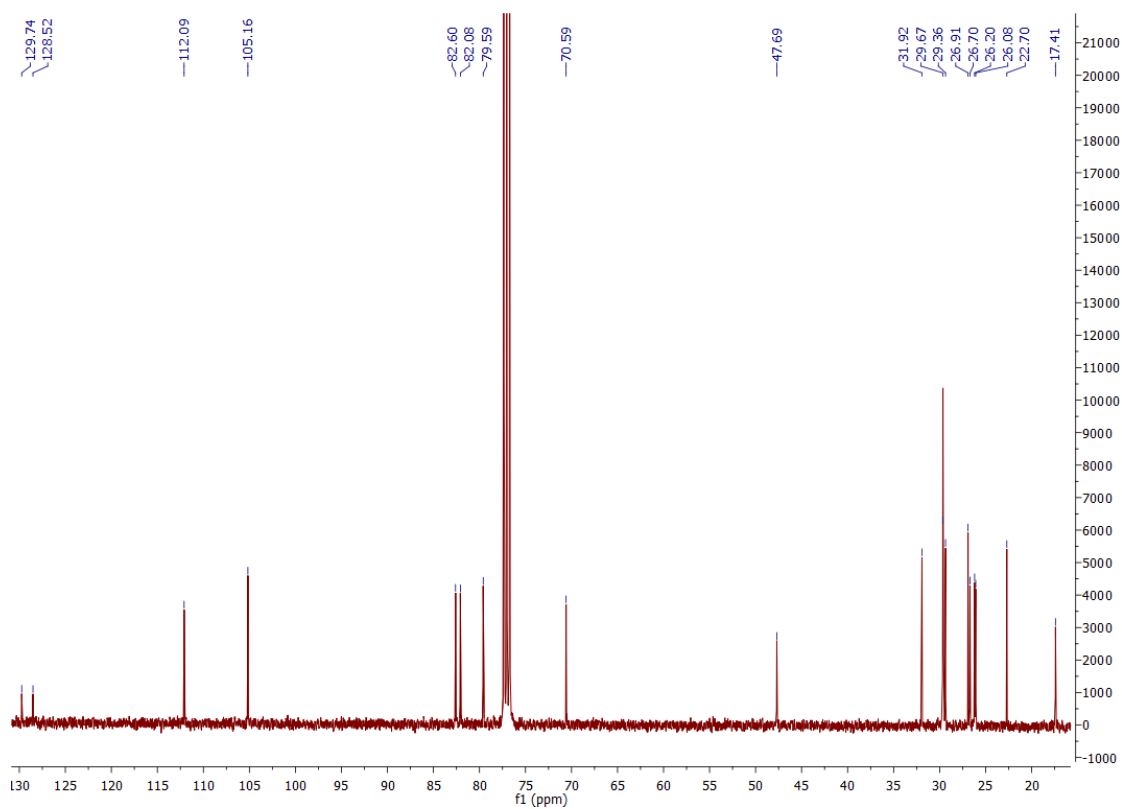


A1.37. Espectros de RMN do composto 48

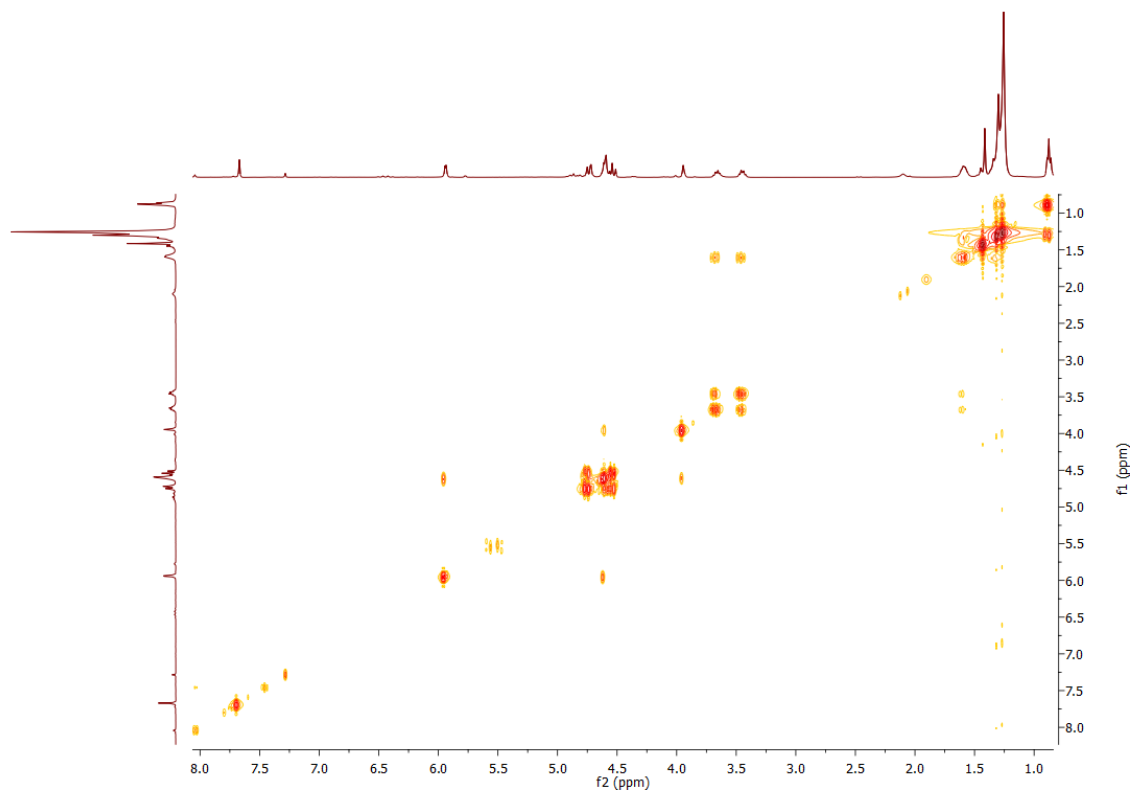
Anexo A 1.37.1. Espectro de ^1H -RMN



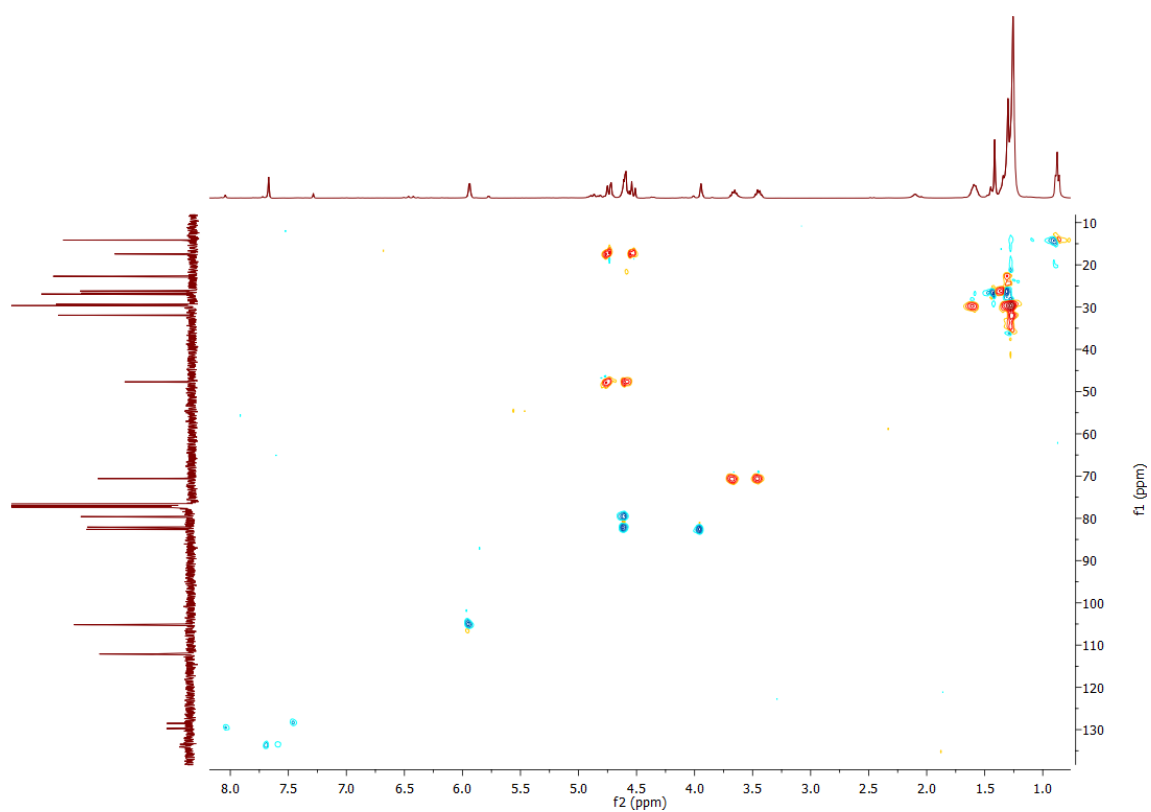
Anexo A 1.37.3. Espectro de ^{13}C -RMN



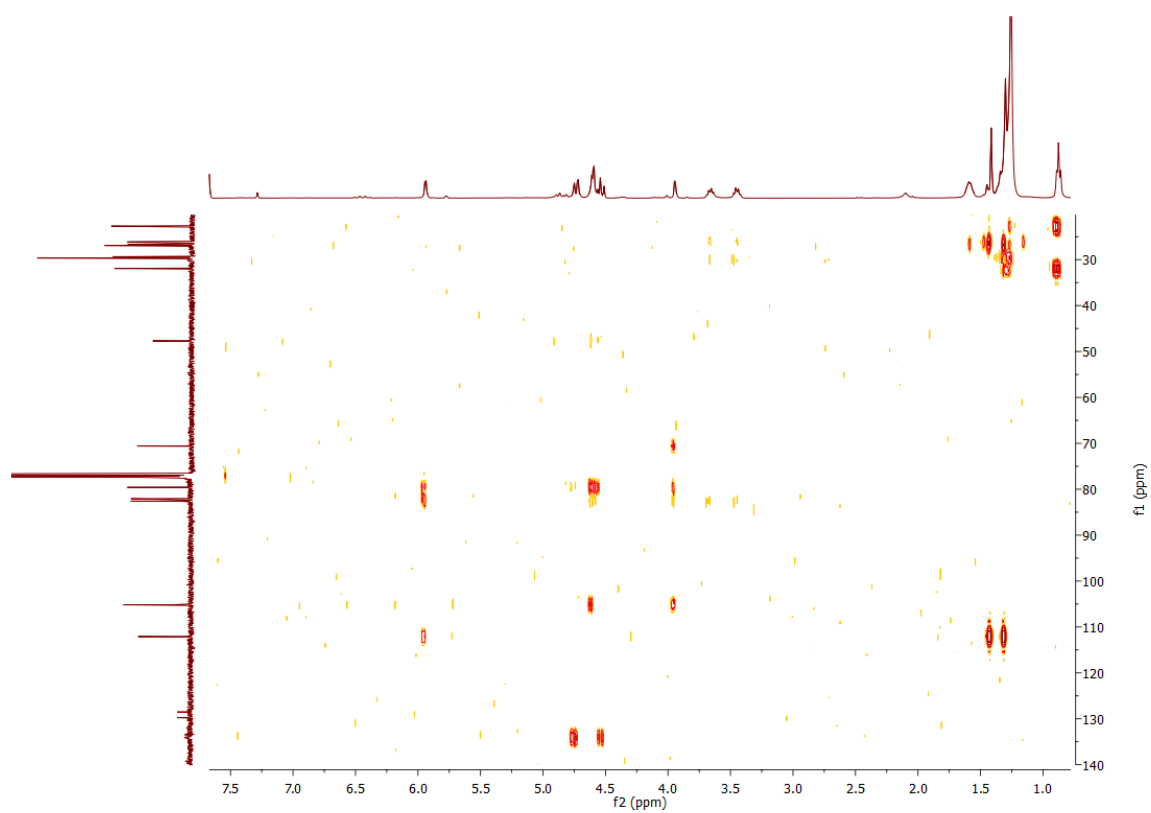
Anexo A 1.37.2. Espectro de COSY



Anexo A 1.37.4. Espectro de HSQC

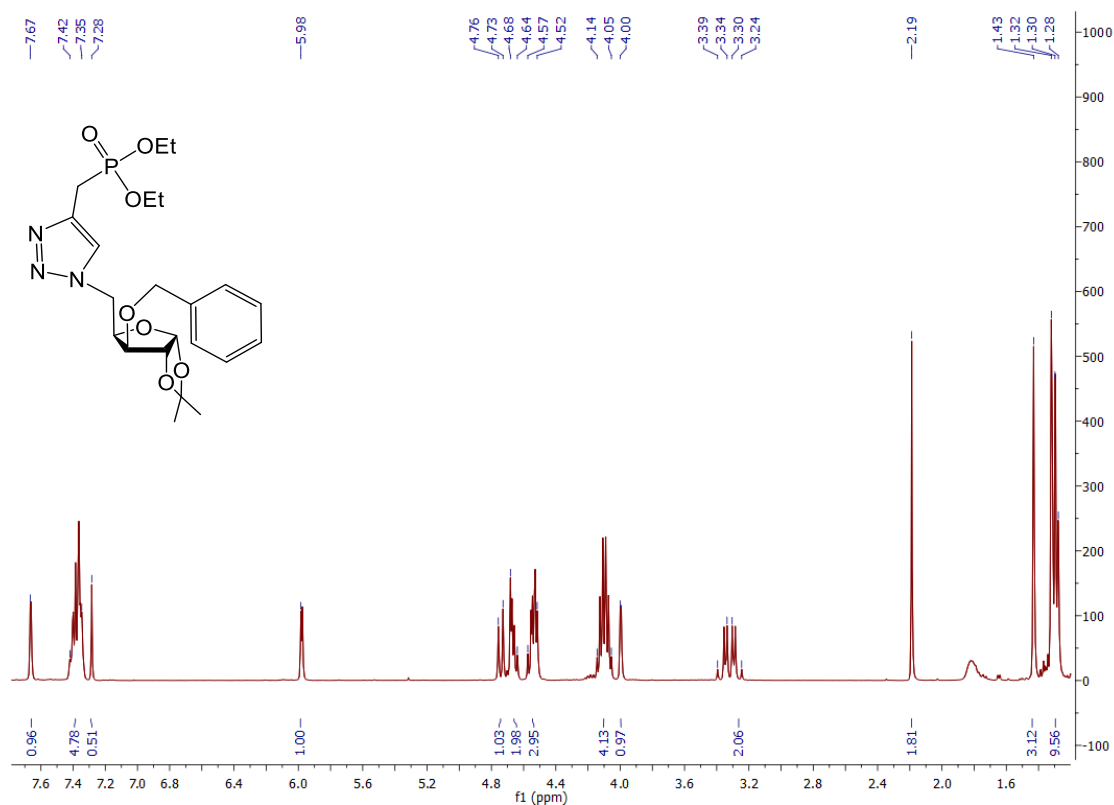


Anexo A 1.37.5. Espectro de HMBC

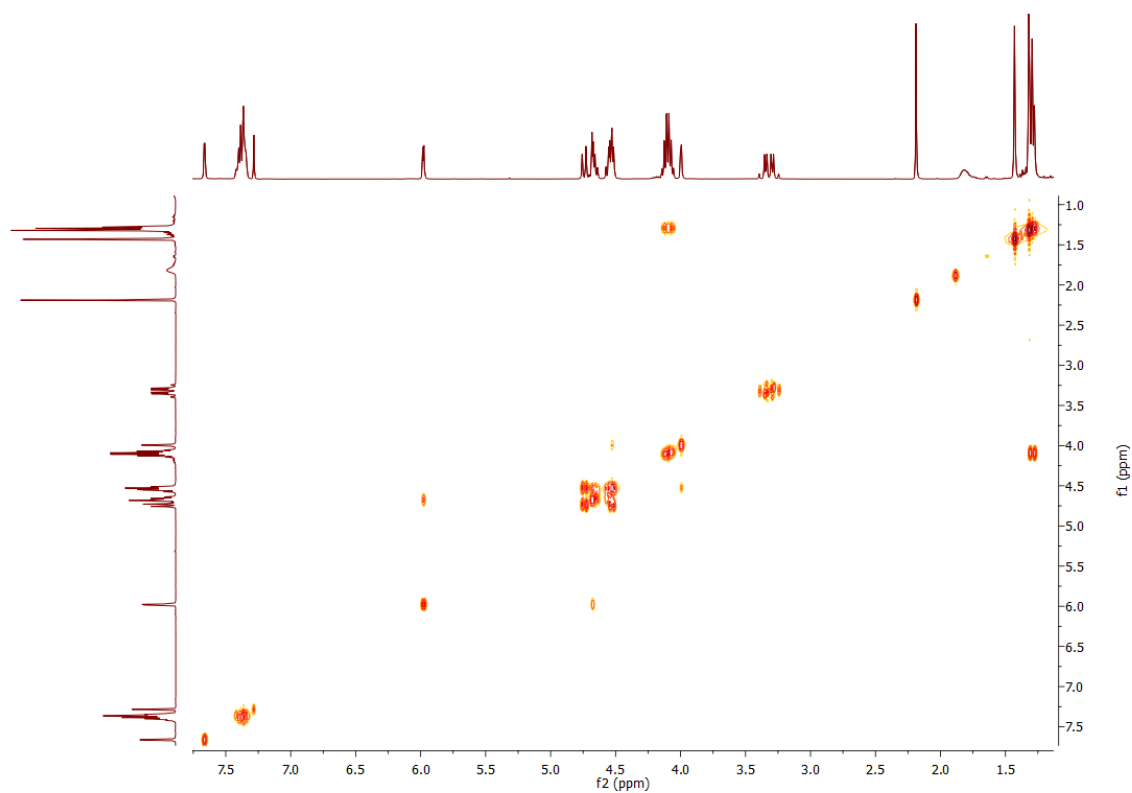


A1.38. Espetros de RMN do composto 49

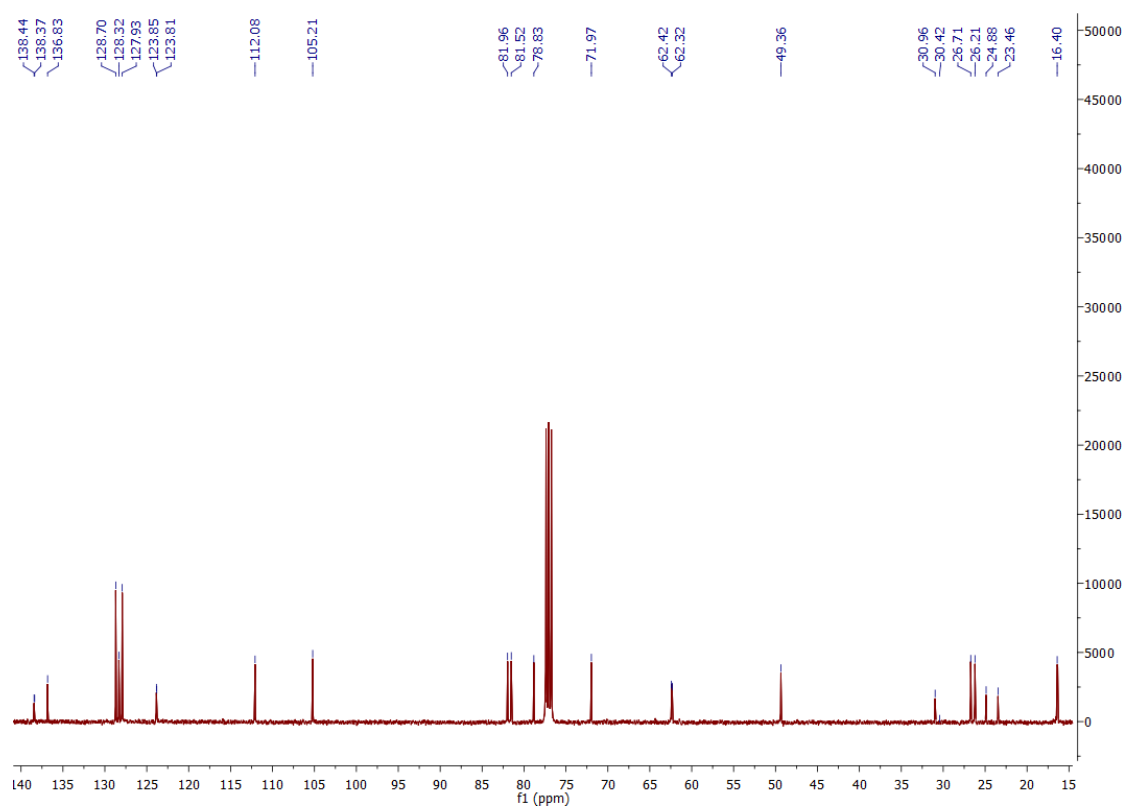
Anexo A 1.38.1. Espetro de ¹H-RMN



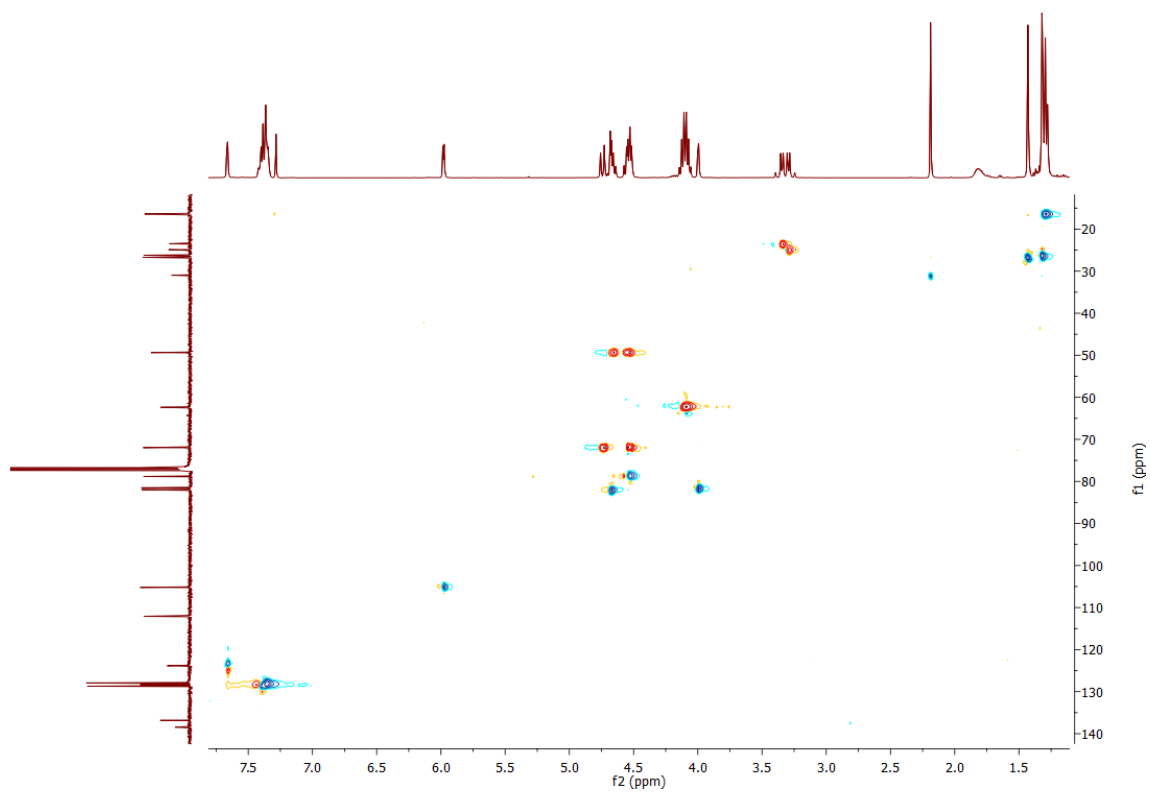
Anexo A 1.38.2. Espetro de COSY



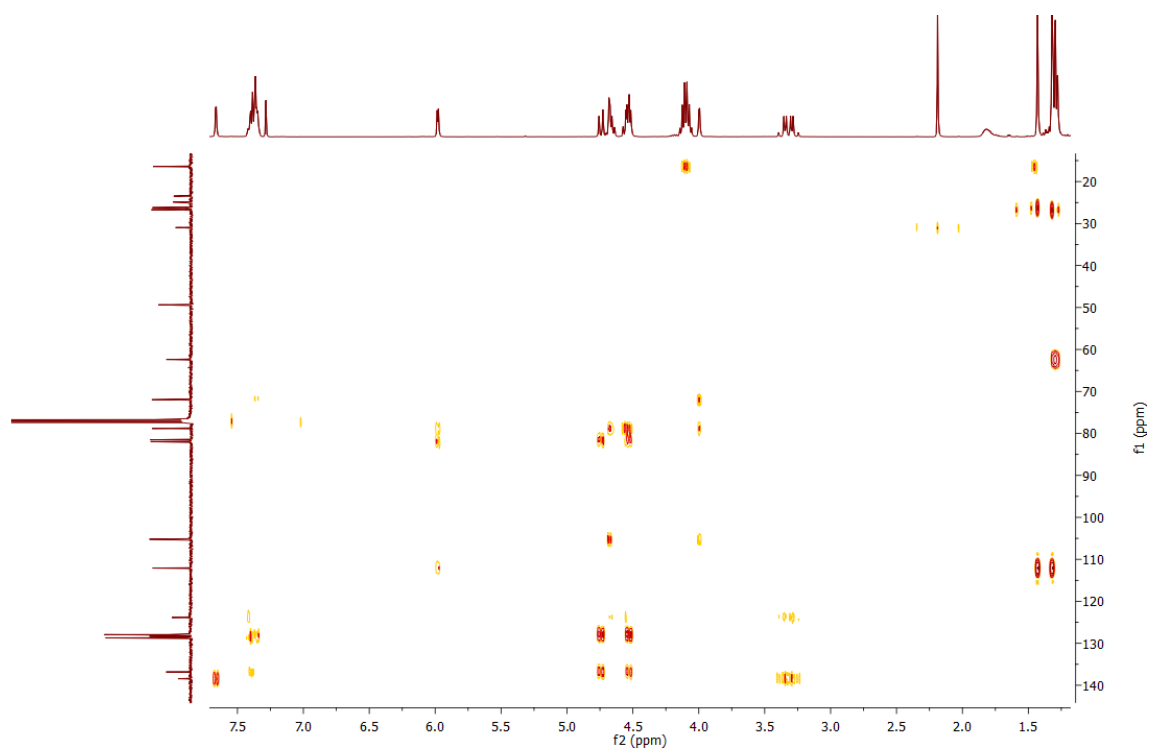
Anexo A 1.38.3. Espectro de ^{13}C -RMN



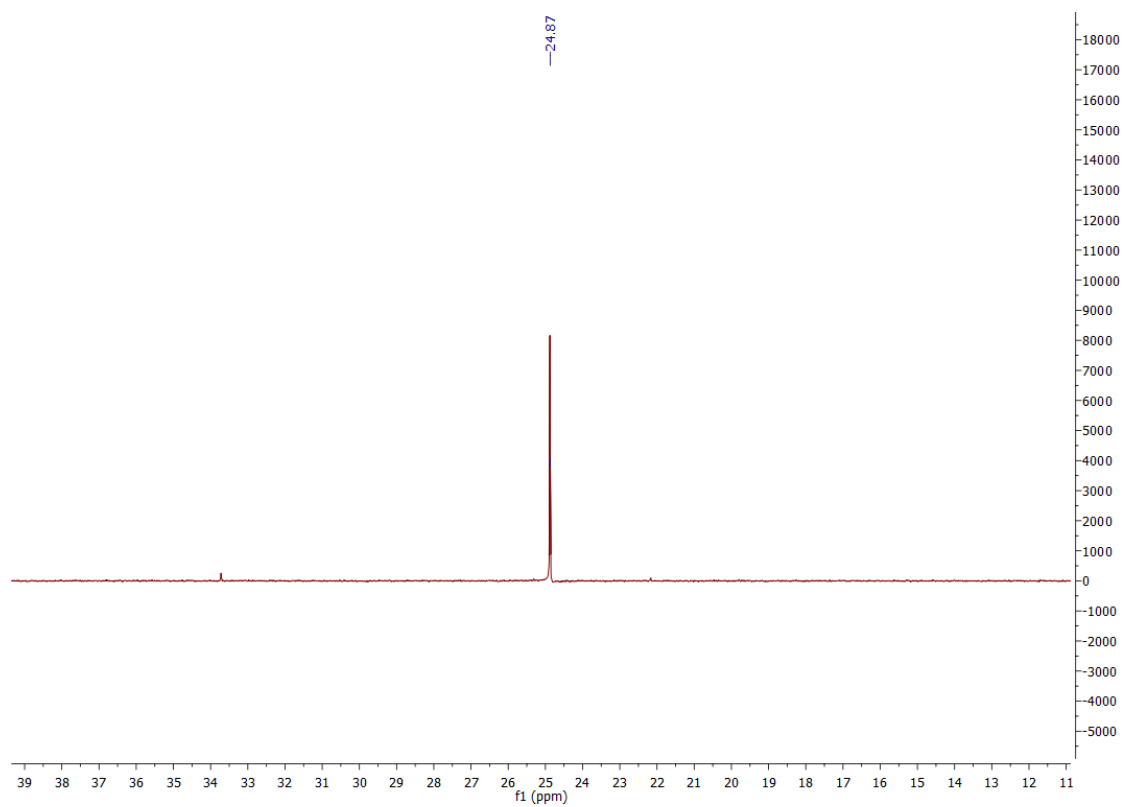
Anexo A 1.38.4. Espectro de HSQC



Anexo A 1.38.5. Espectro de HMBC

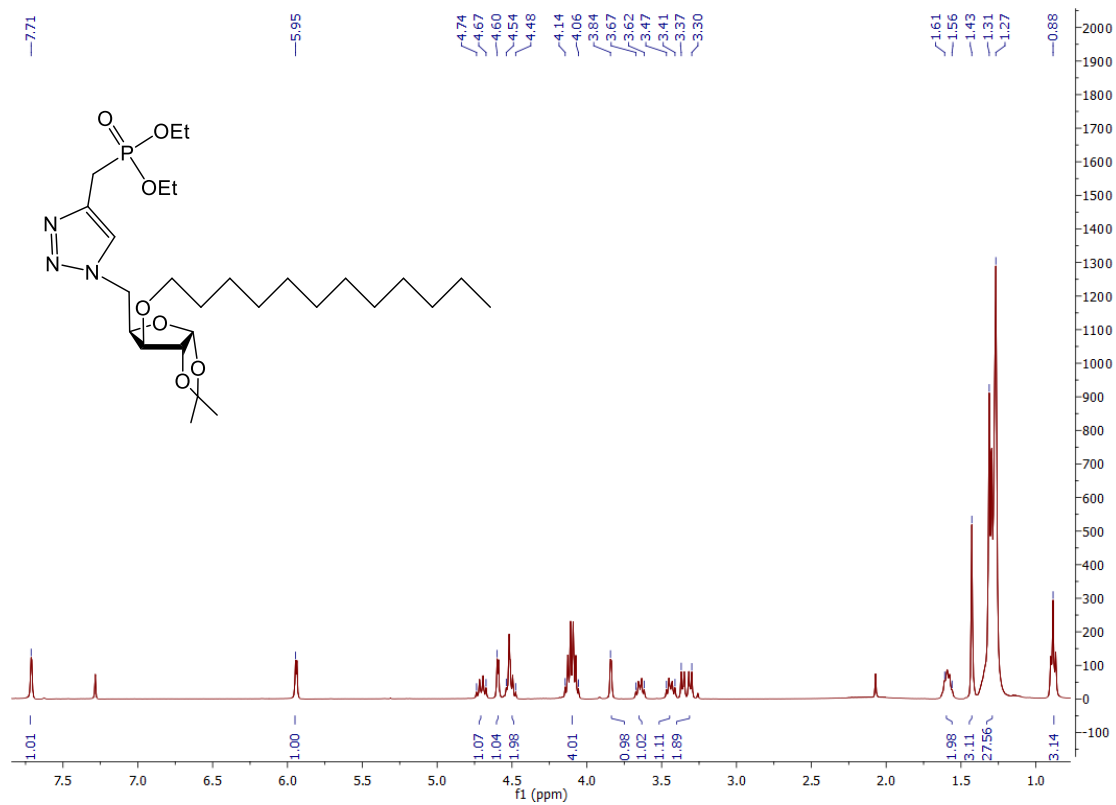


Anexo A 1.38.6. Espectro de ^{31}P -RMN

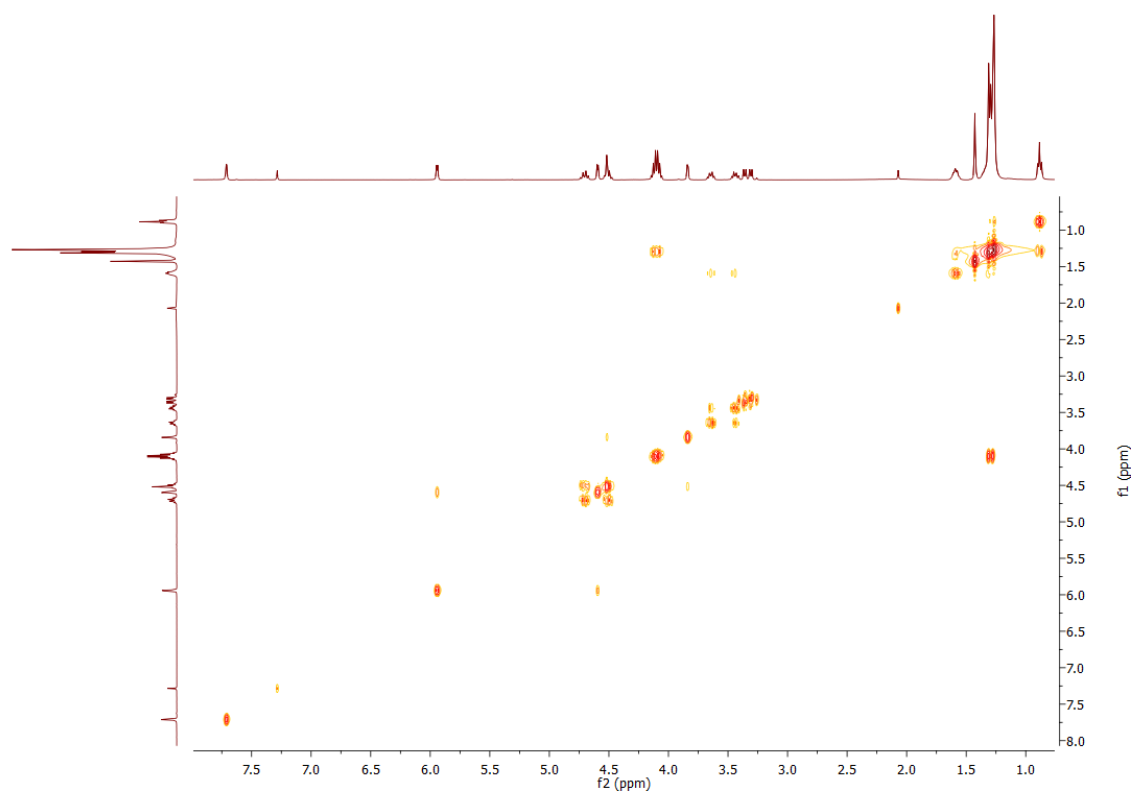


A1.39. Espetros de RMN do composto 50

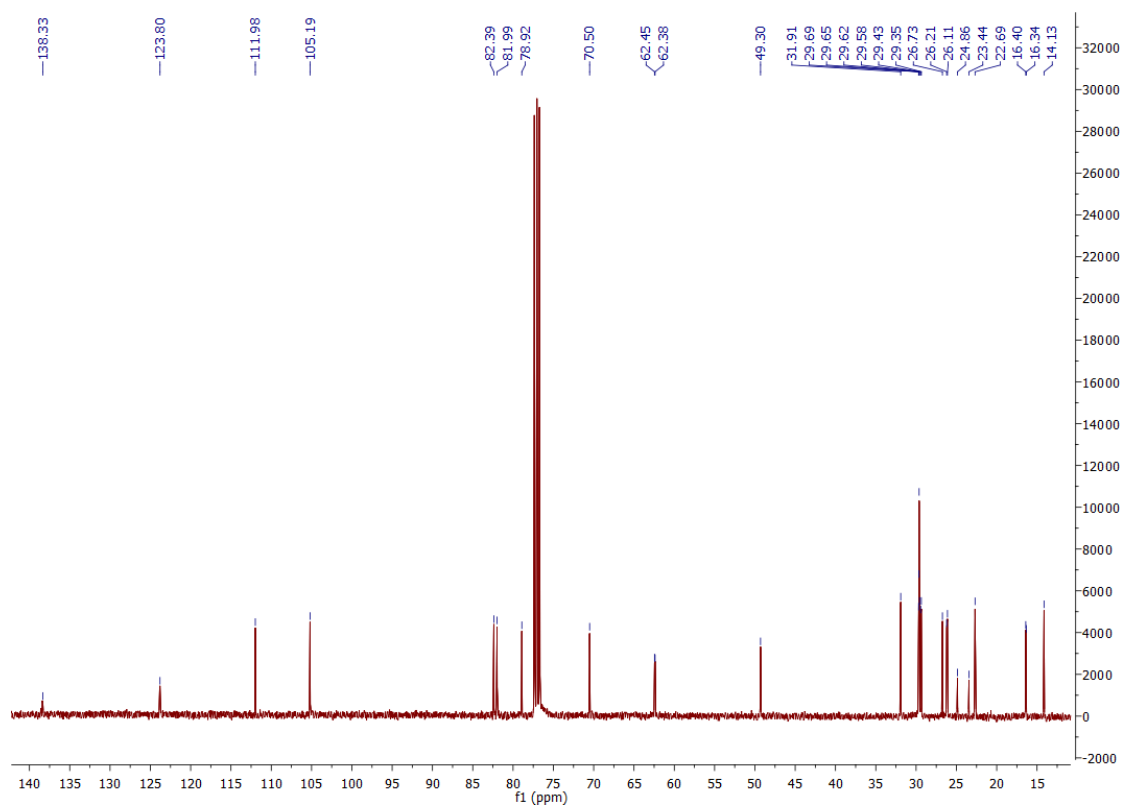
Anexo A 1.39.1. Espectro de ^1H -RMN



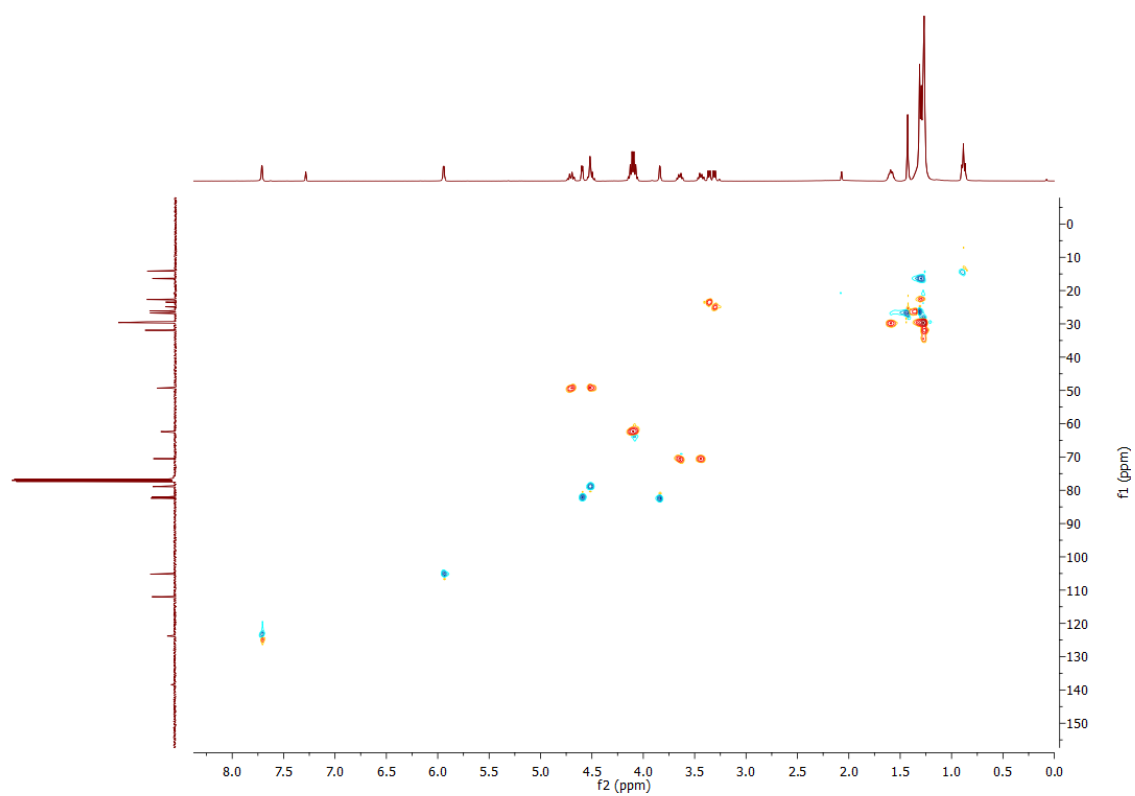
Anexo A 1.39.2. Espectro de COSY



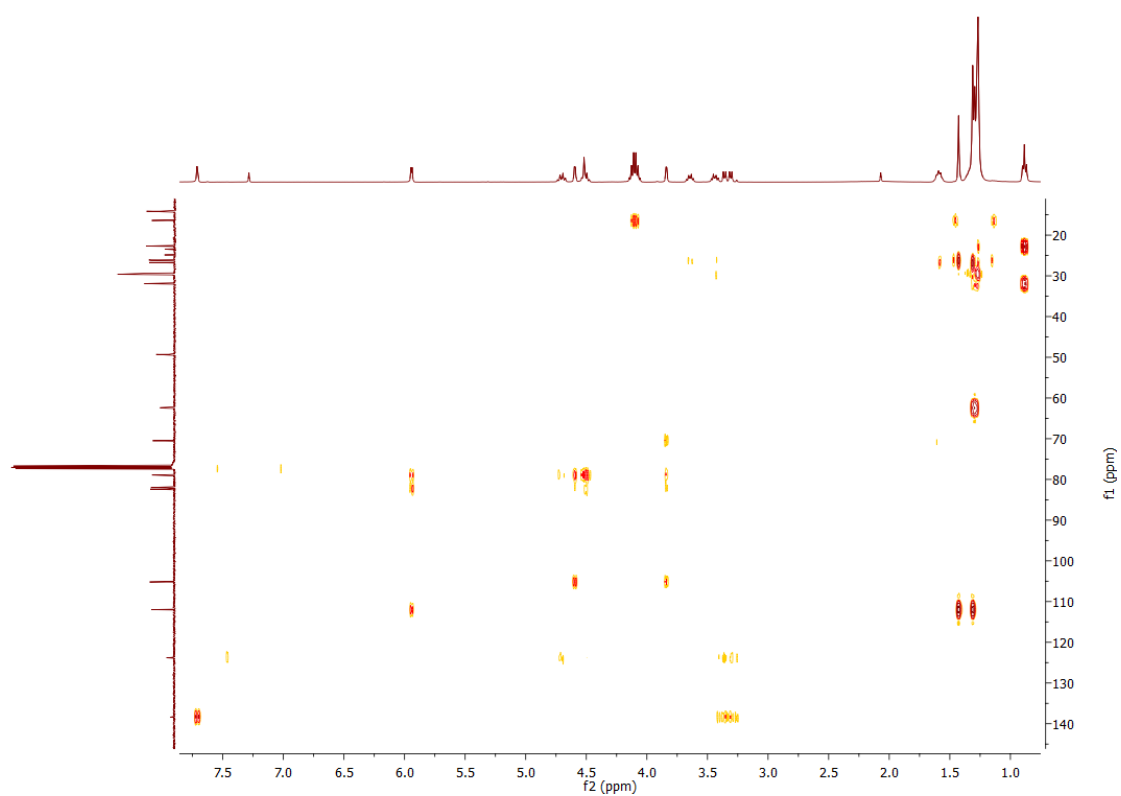
Anexo A 1.39.3. Espectro de ^{13}C -RMN



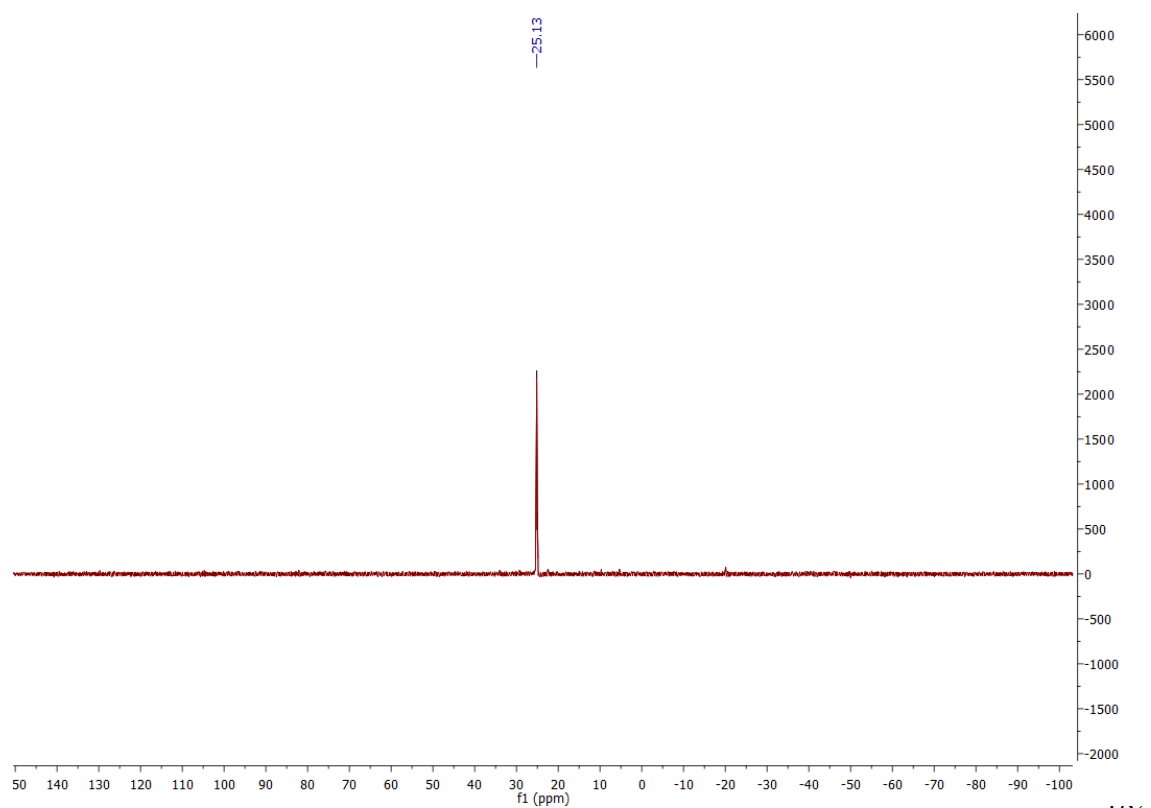
Anexo A 1.39.4. Espectro de HSQC



Anexo A 1.39.5. Espectro de HMBC

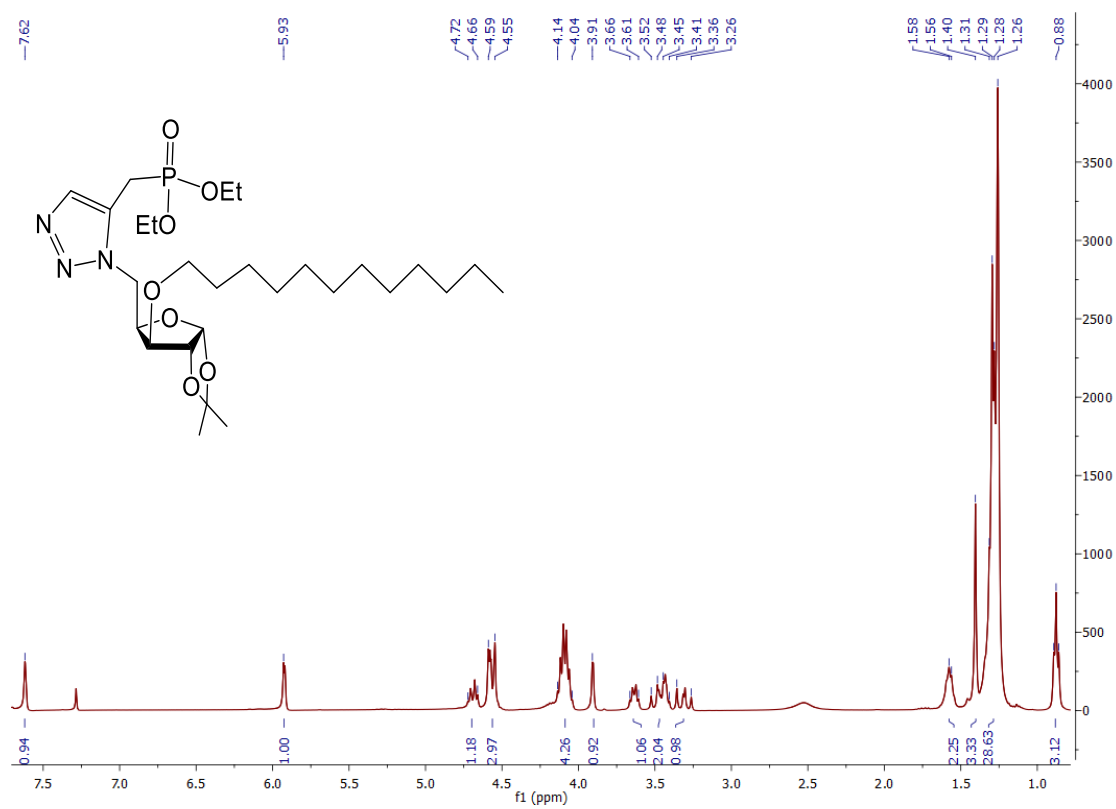


Anexo A 1.39.6. Espectro de ^{31}P -RMN

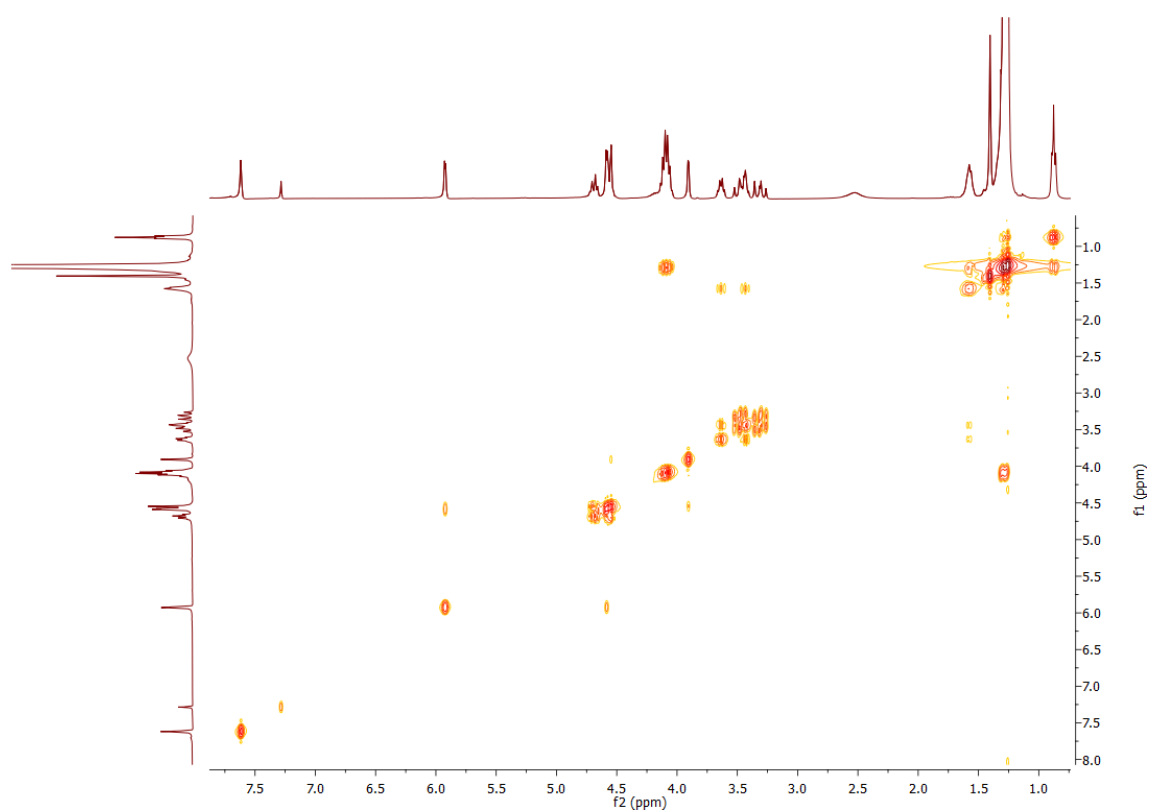


A1.40. Espectros de RMN do composto 51

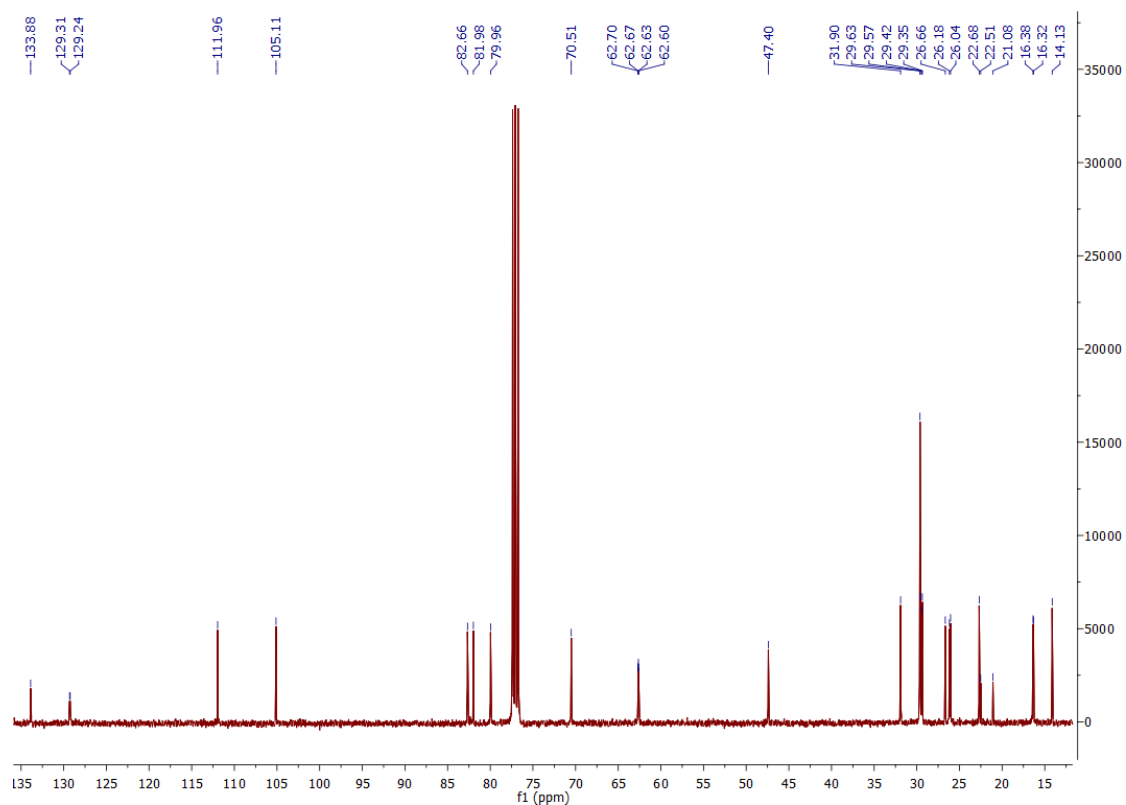
Anexo A 1.40.1. Espectro de ^1H -RMN



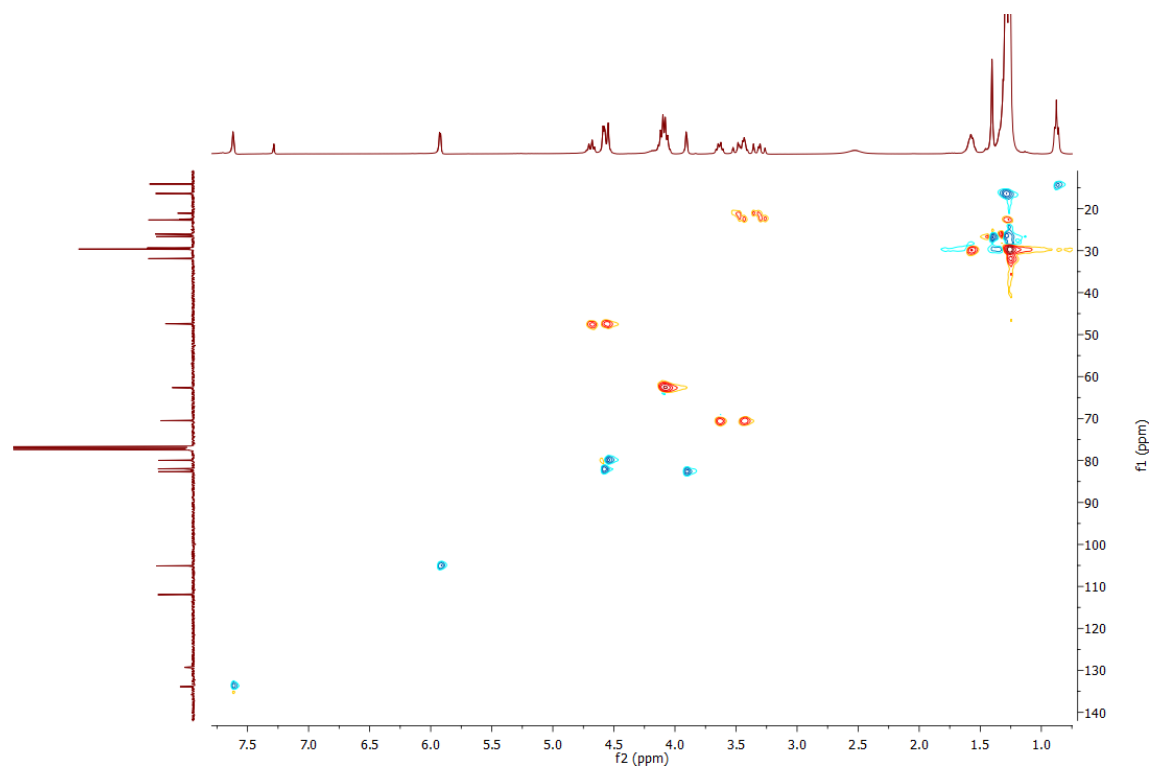
Anexo A 1.40.2. Espectro de COSY



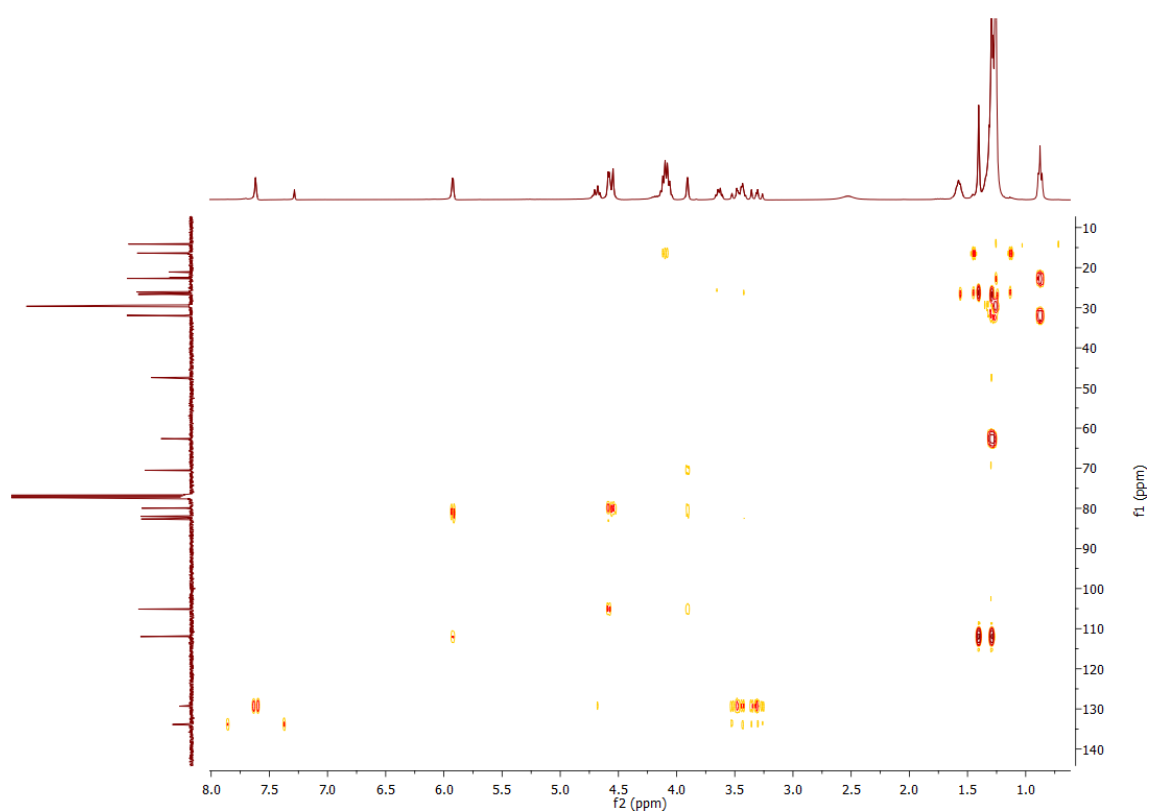
Anexo A 1.40.3. Espectro de ^{13}C -RMN



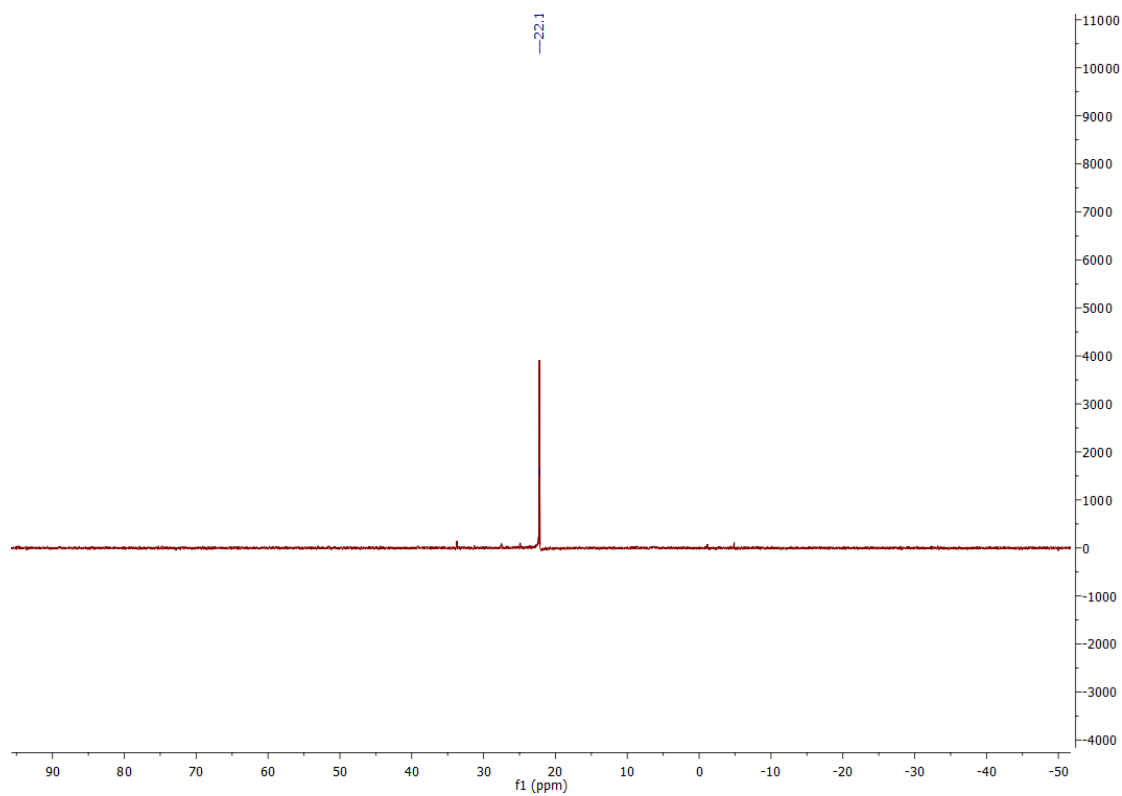
Anexo A 1.40.4. Espectro de HSQC



Anexo A 1.40.5. Espectro de HMBC

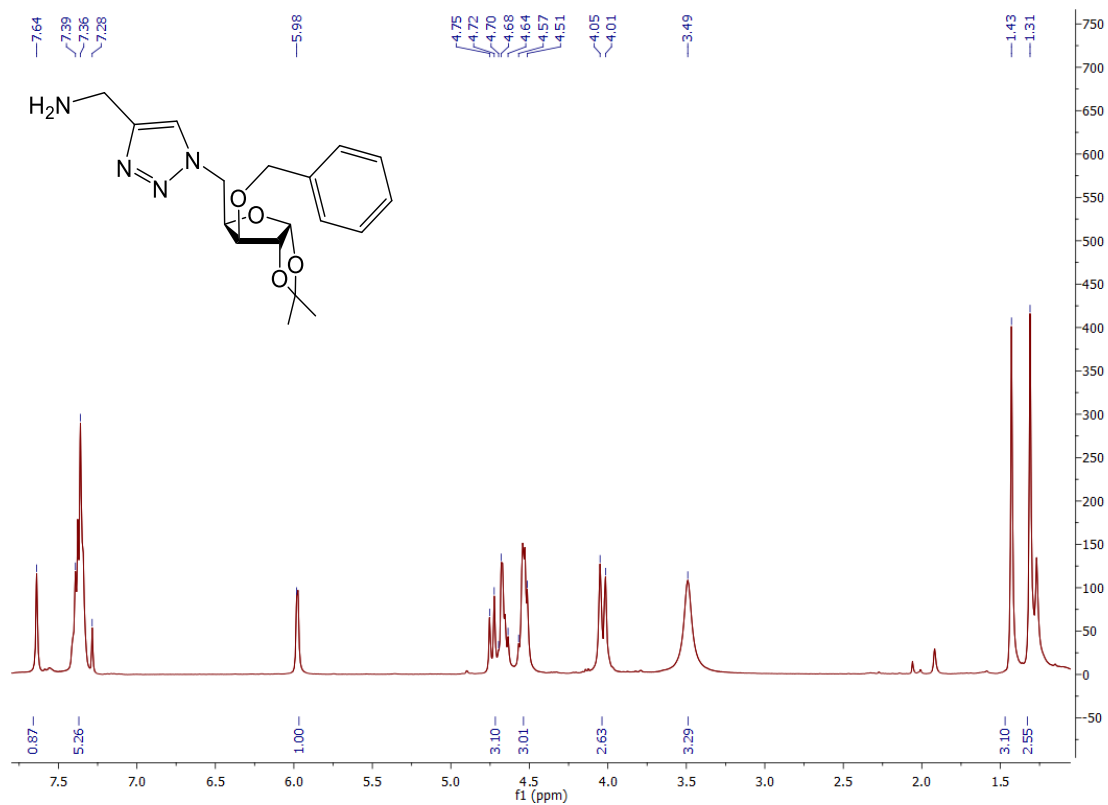


Anexo A 1.40.6. Espectro de ^{31}P -RMN

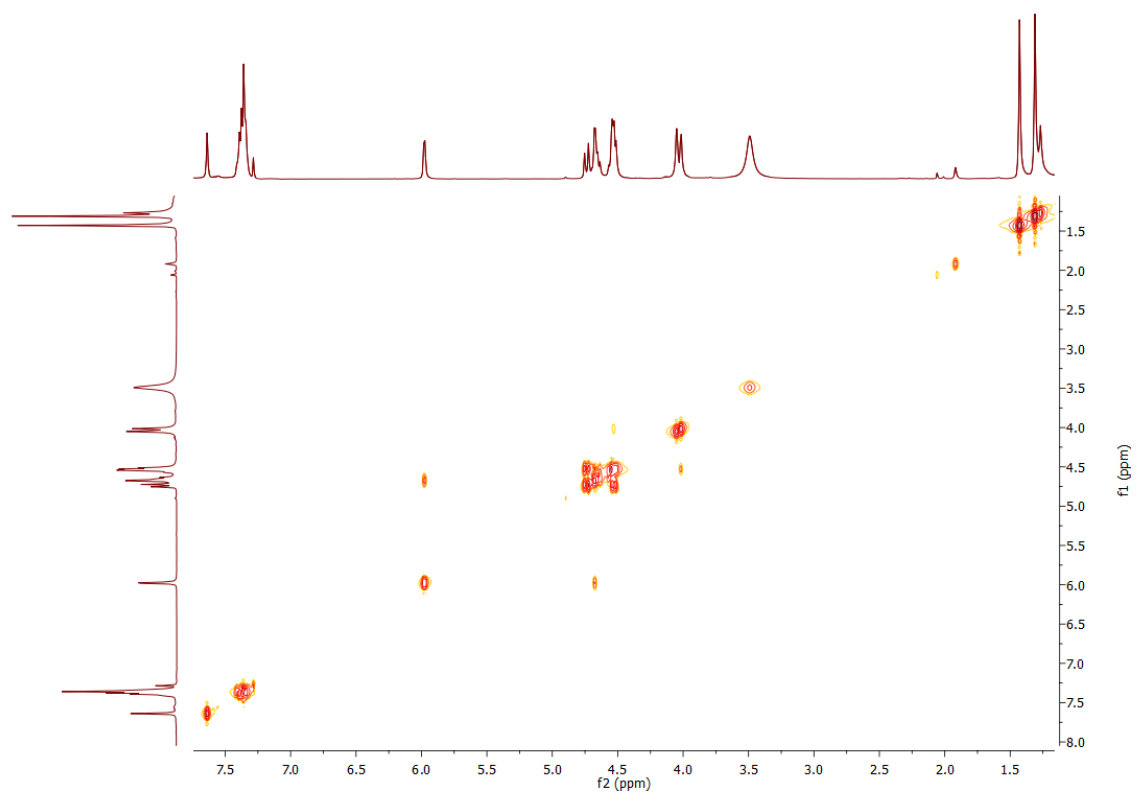


A1.41. Espectros de RMN do composto 52

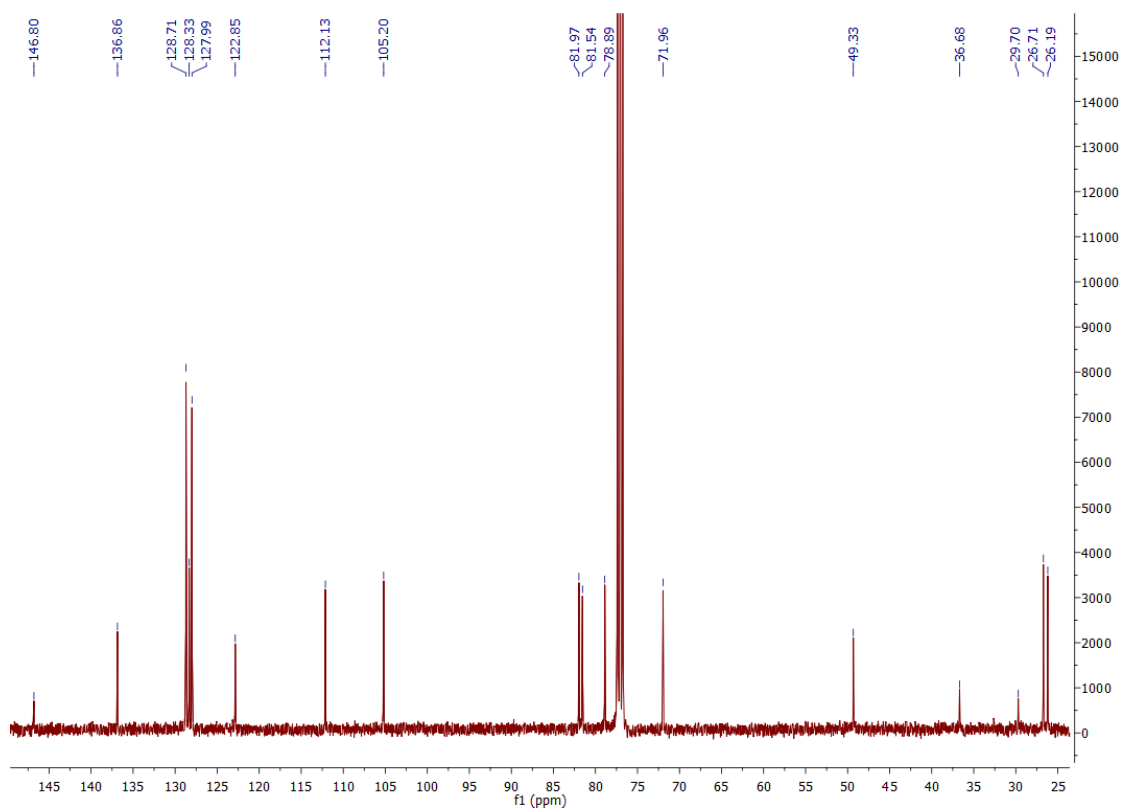
Anexo A 1.41.1. Espectro de ^1H -RMN



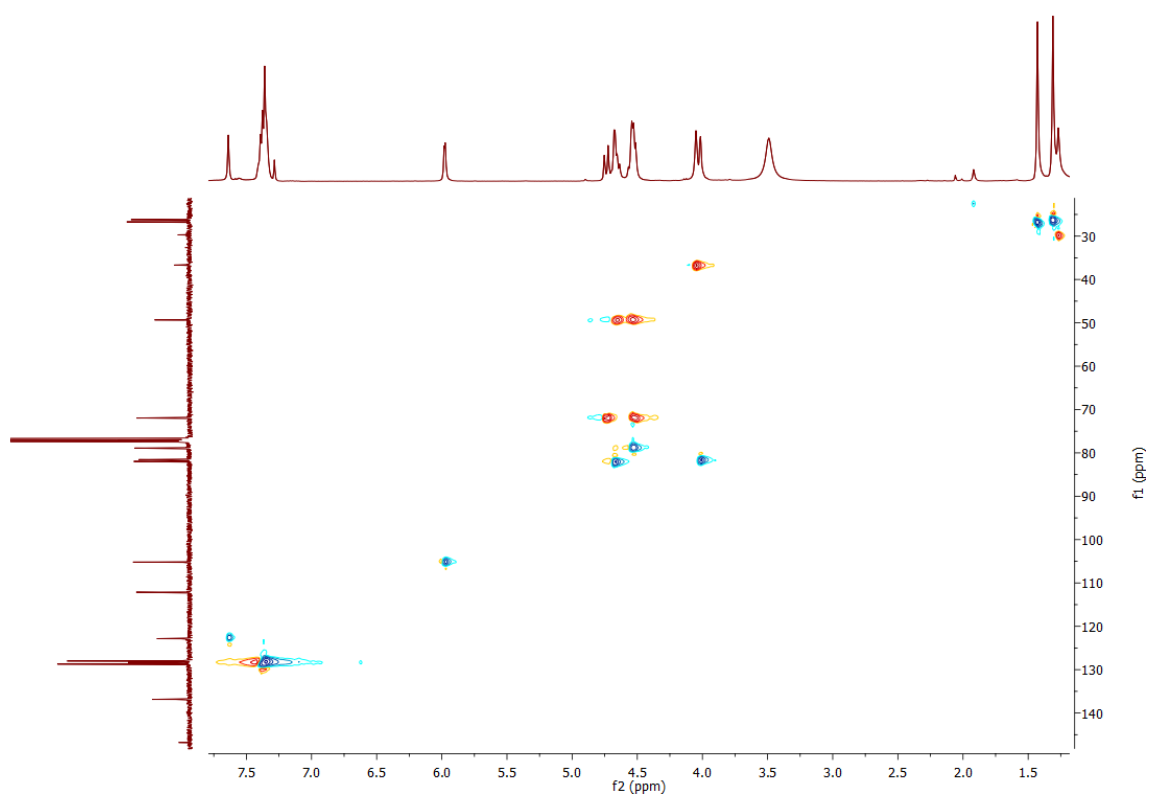
Anexo A 1.41.2. Espectro de COSY



Anexo A 1.41.3. Espectro de ^{13}C -RMN

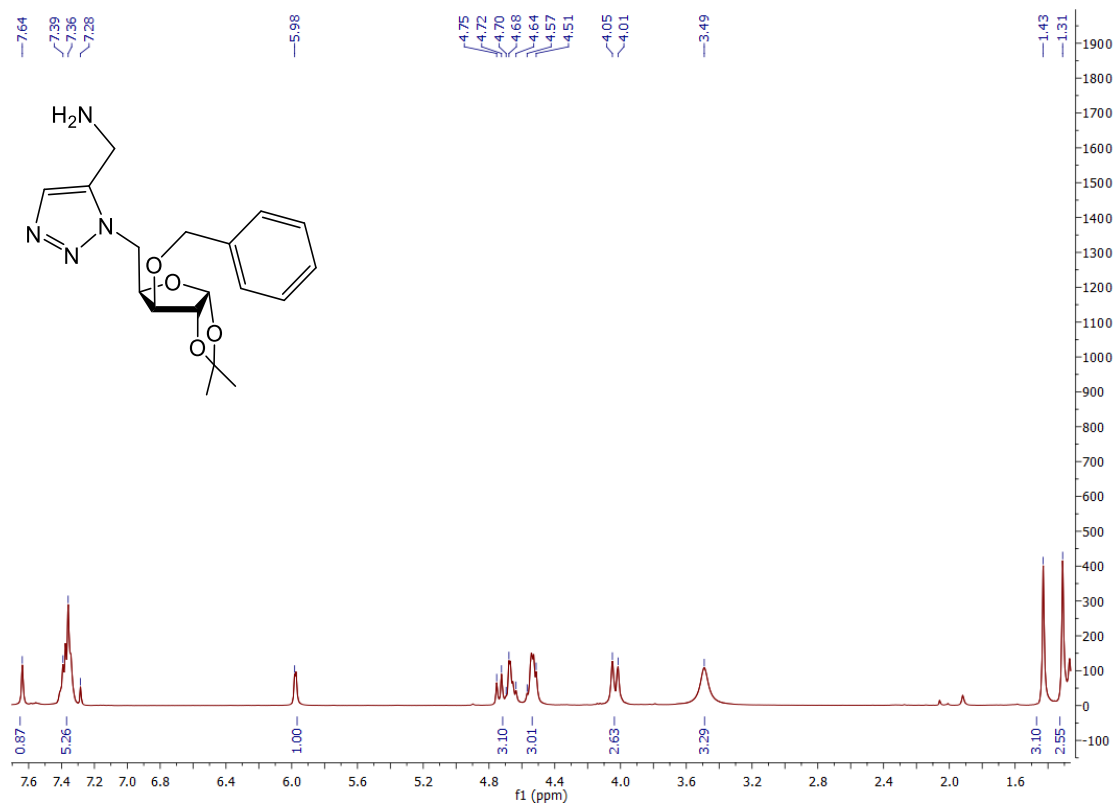


Anexo A 1.41.4. Espectro de HSQC

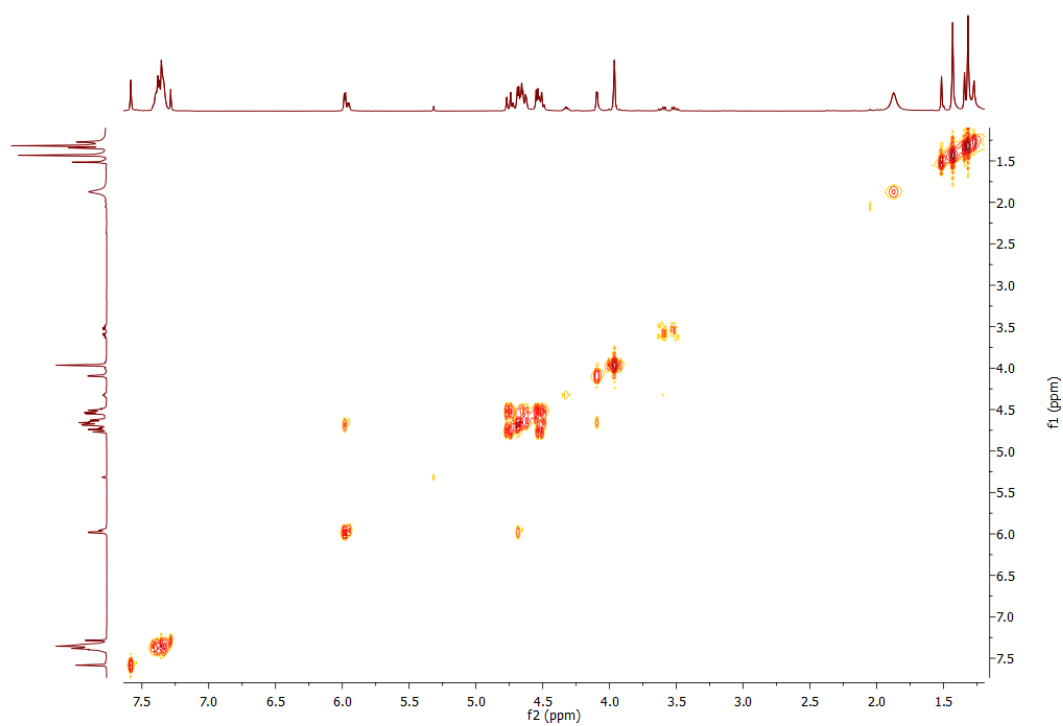


A1.42. Espetros de RMN do composto 53

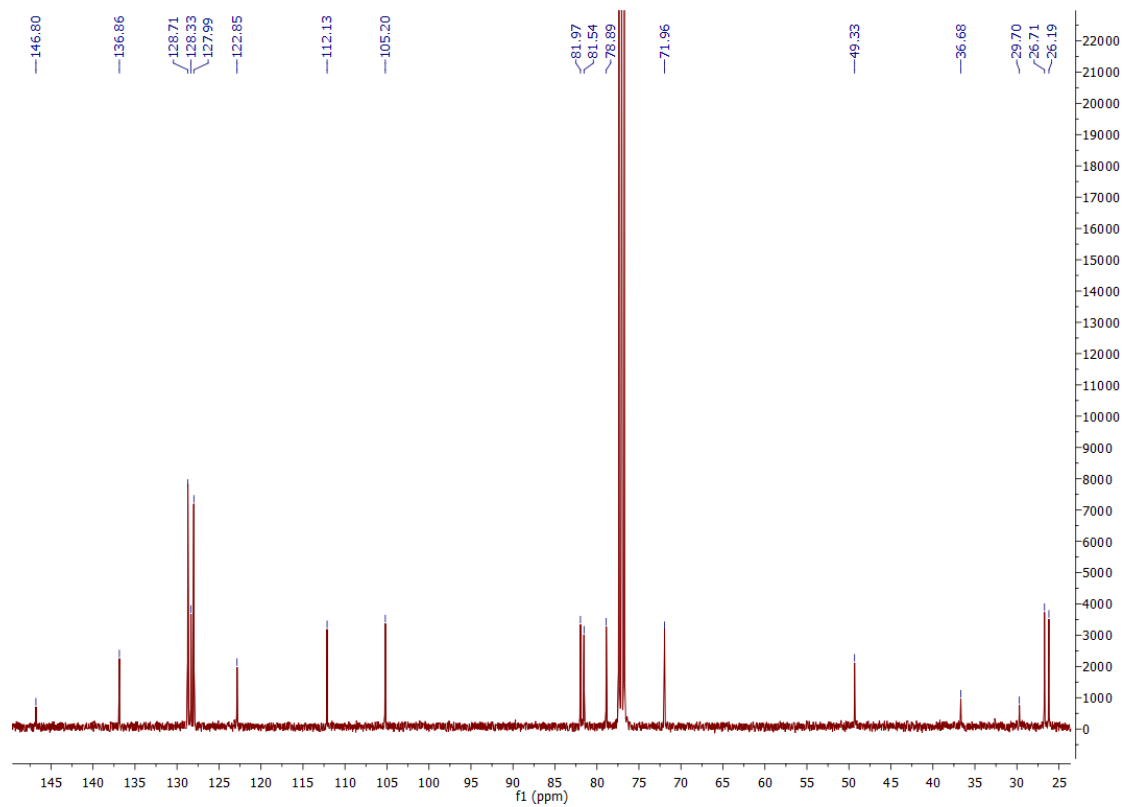
Anexo A 1.42.1. Espectro de ^1H -RMN



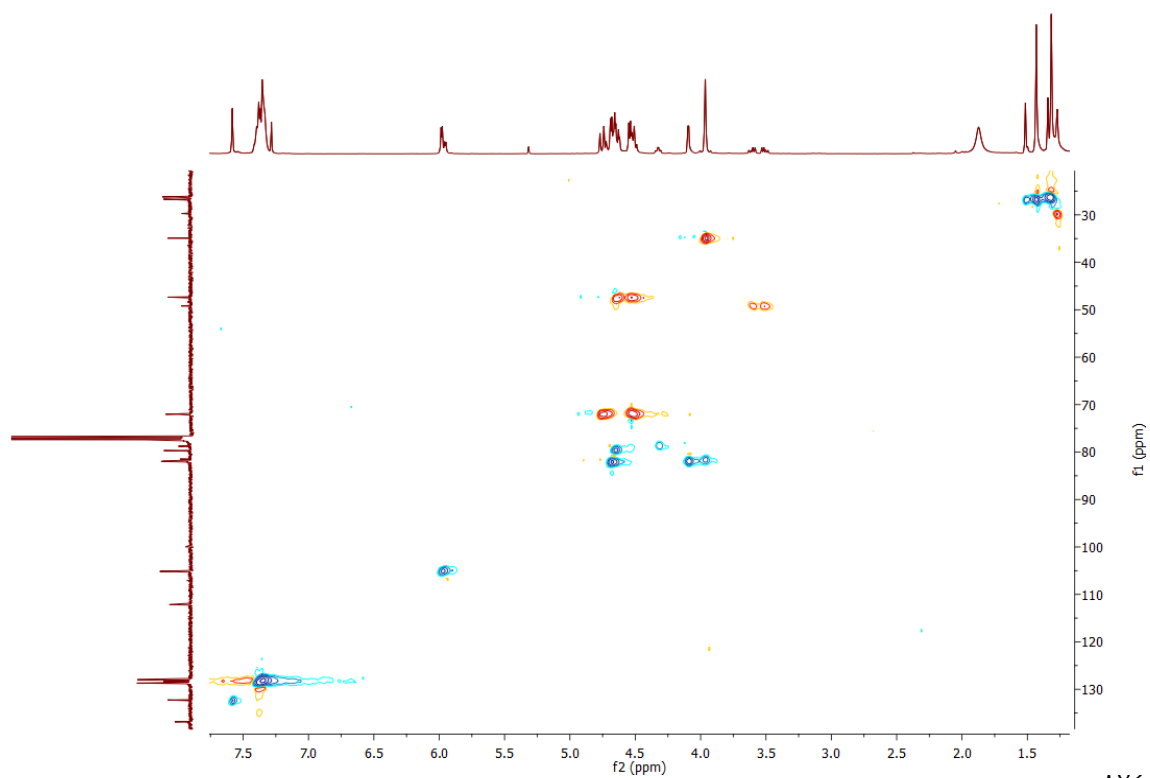
Anexo A 1.42.2. Espectro de COSY



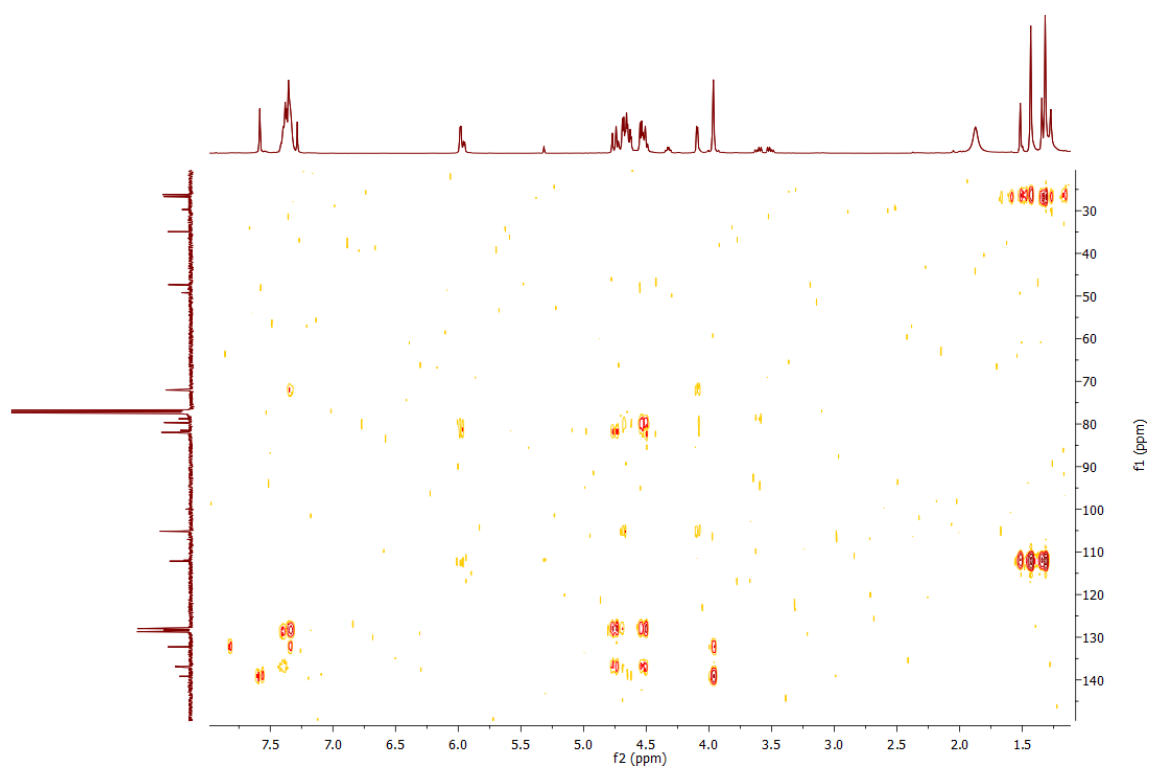
Anexo A 1.42.3. Espectro de ^{13}C -RMN



Anexo A 1.42.4. Espectro de HSQC

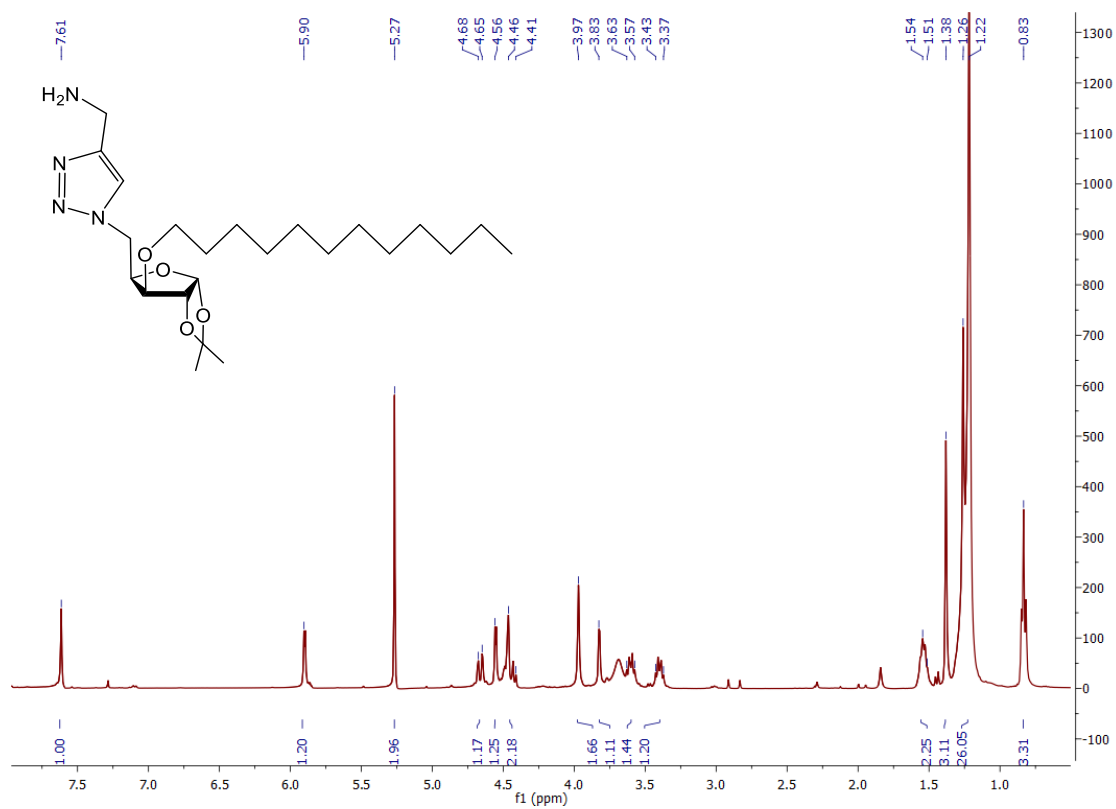


Anexo A 1.42.5. Espetro de HMBC

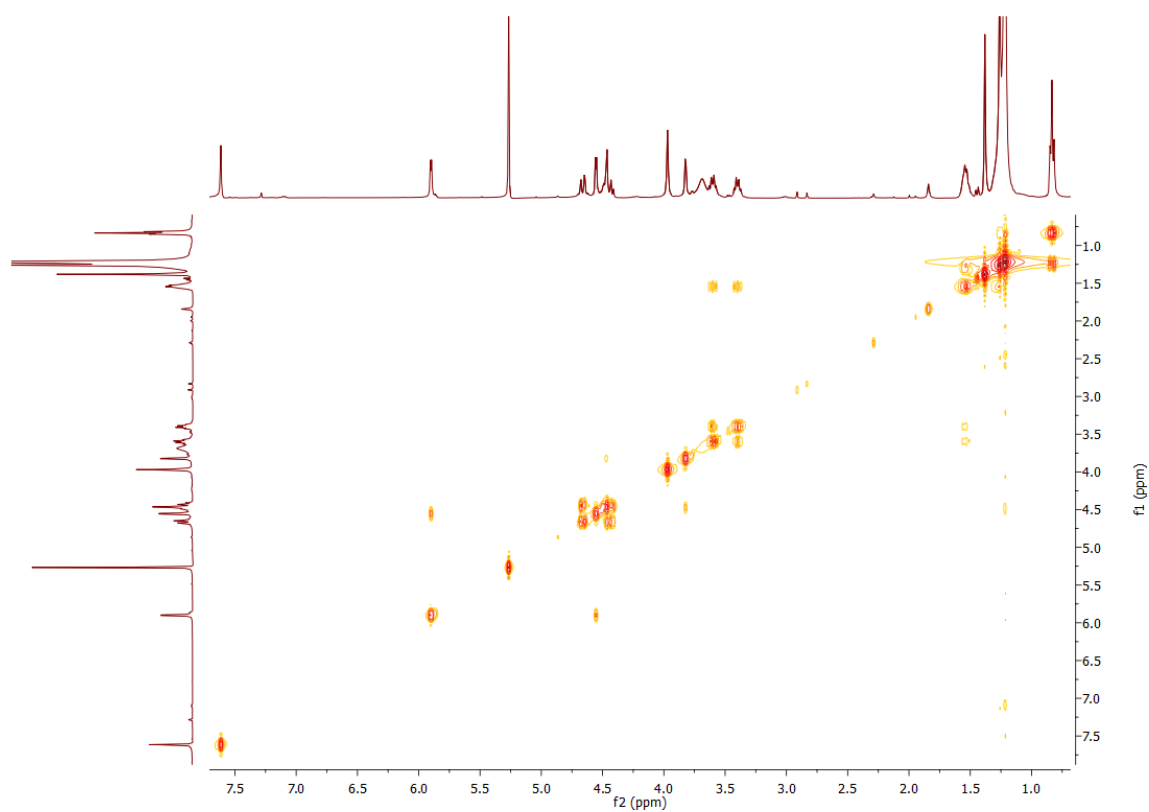


A1.43. Espetros de RMN do composto 54

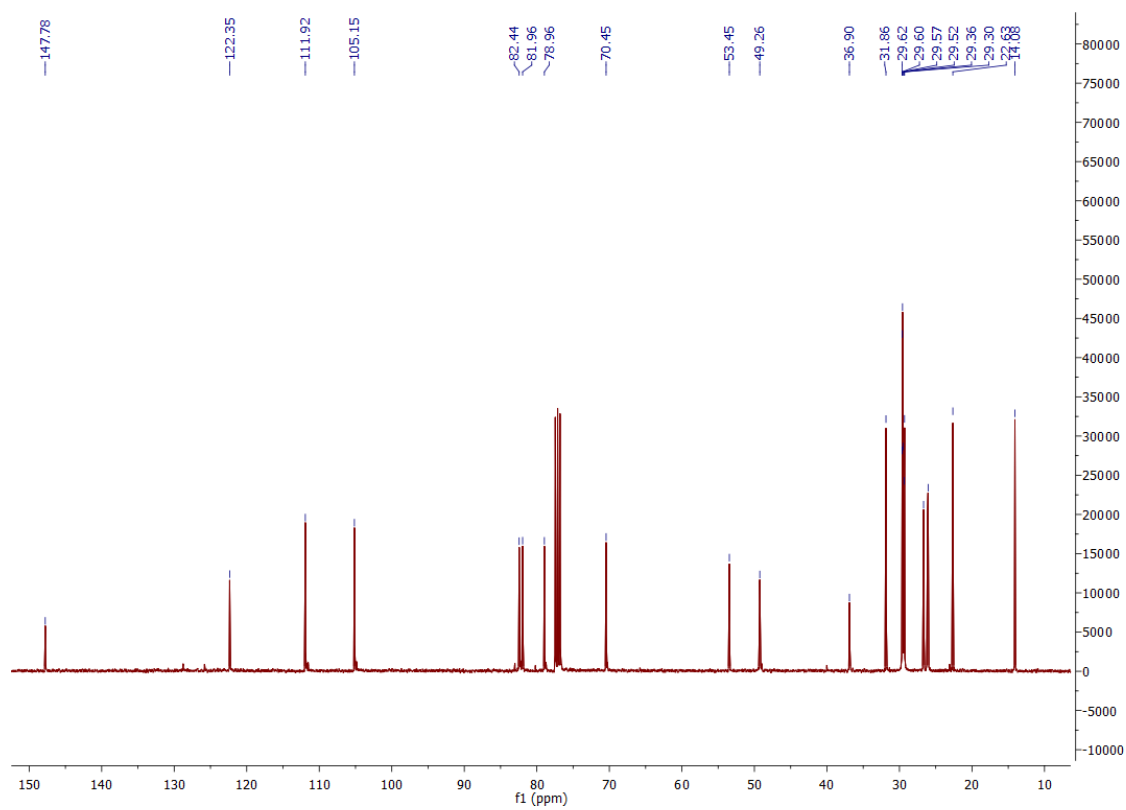
Anexo A 1.43.1. Espetro de ^1H -RMN



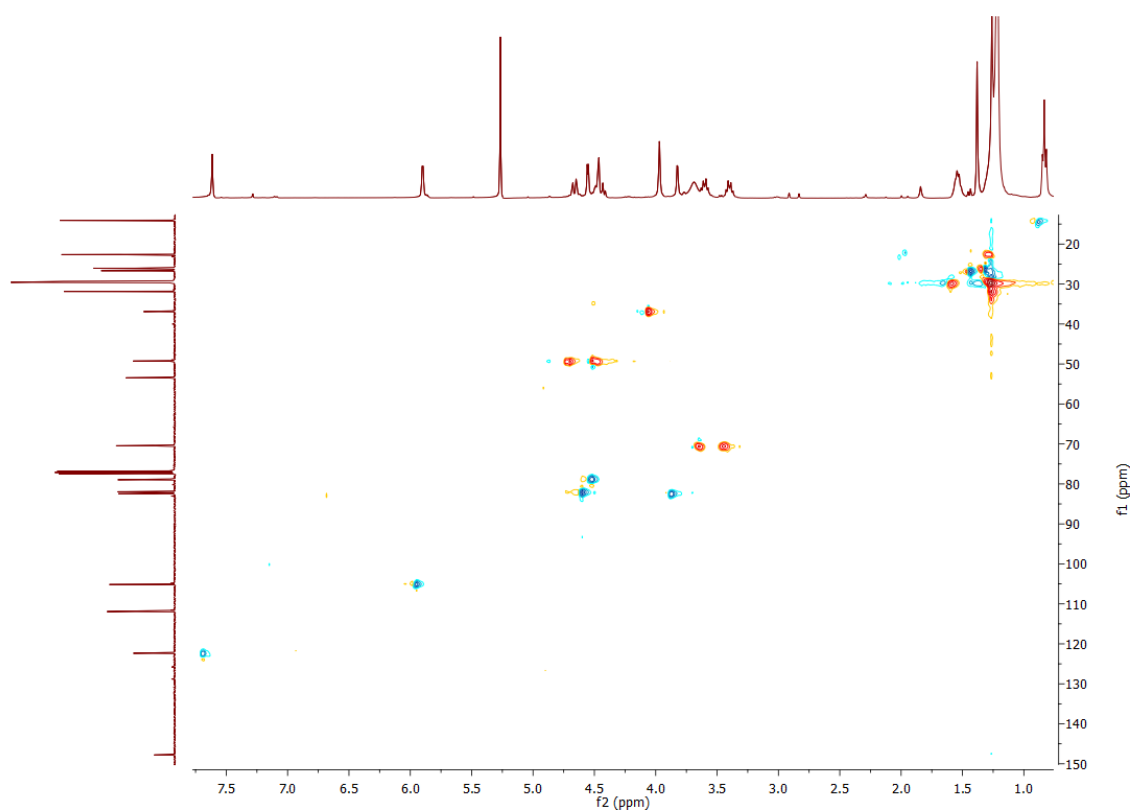
Anexo A 1.43.2. Espectro de COSY



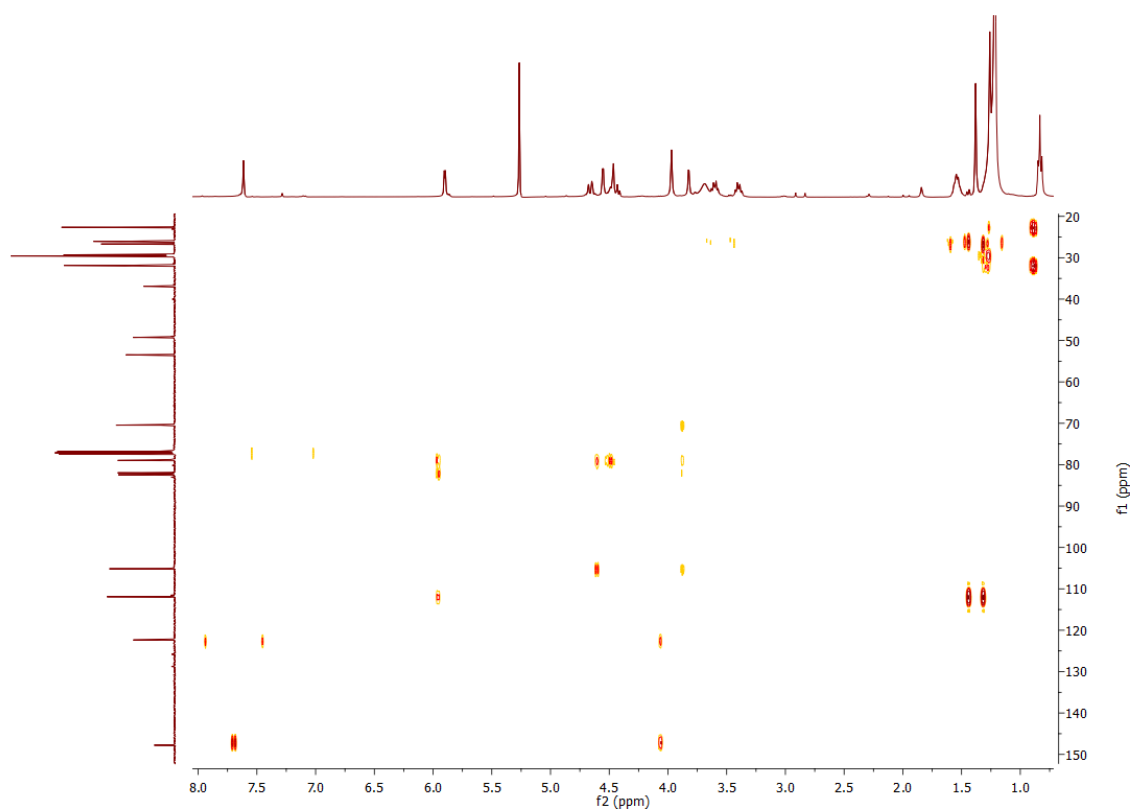
Anexo A 1.43.3. Espectro de ^{13}C -RMN



Anexo A 1.43.4. Espectro de HSQC

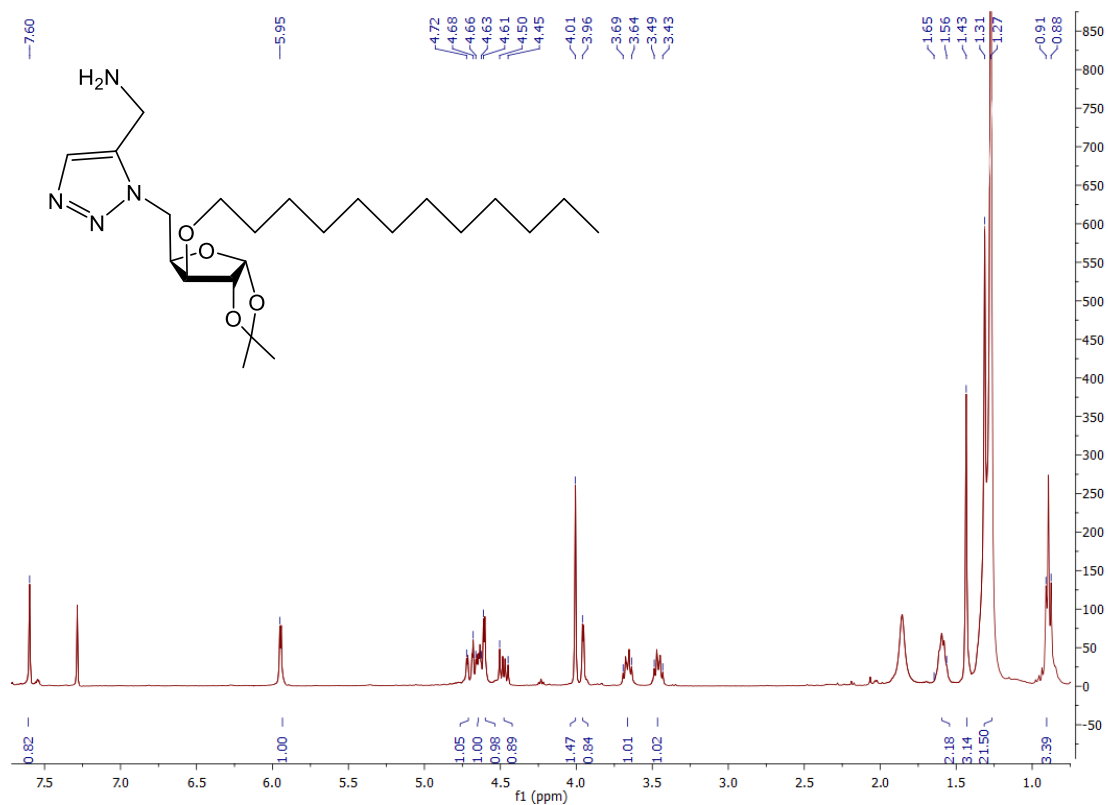


Anexo A 1.43.5. Espectro de HMBC

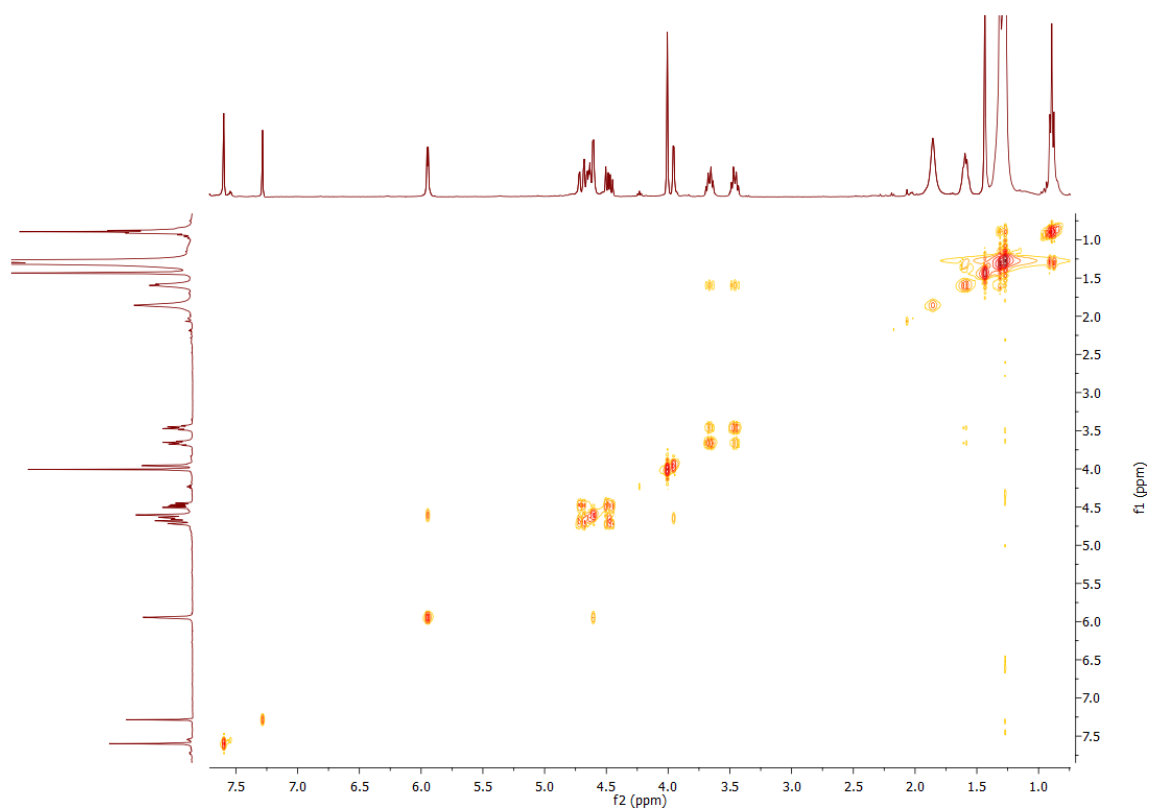


A1.44. Espectros de RMN do composto 55

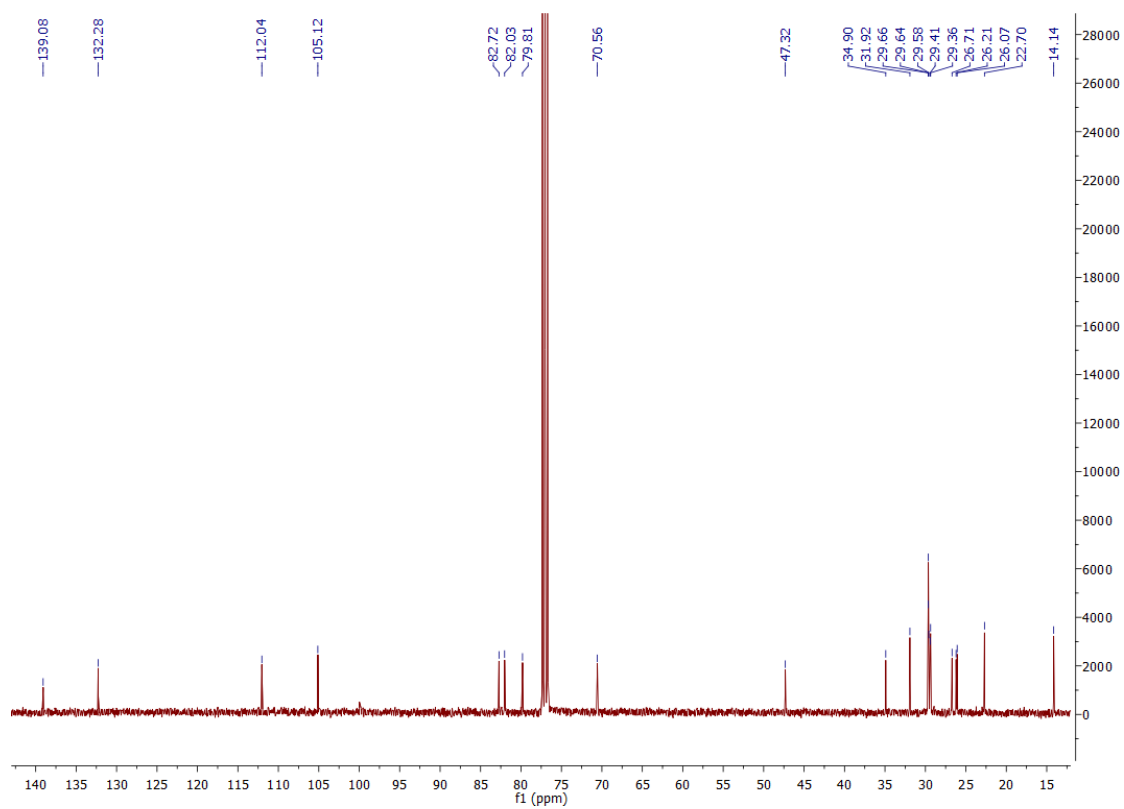
Anexo A 1.44.1. Espectro de ^1H -RMN



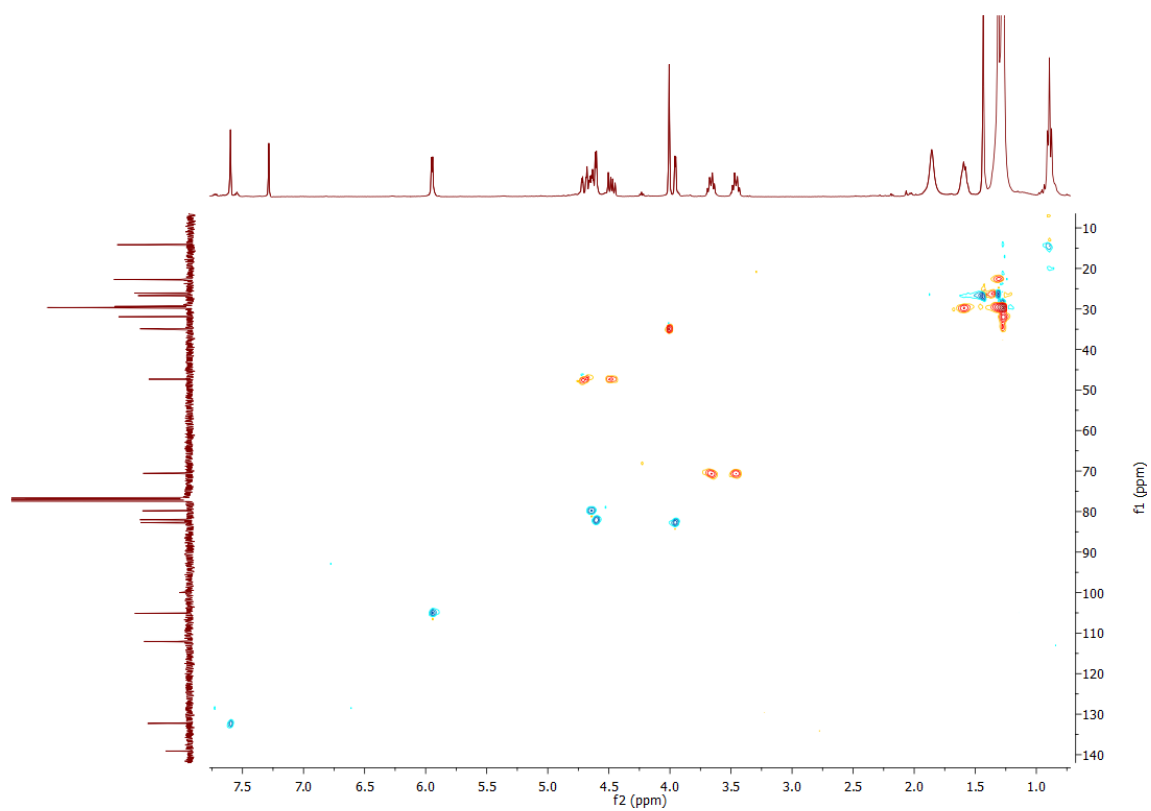
Anexo A 1.44.2. Espectro de COSY



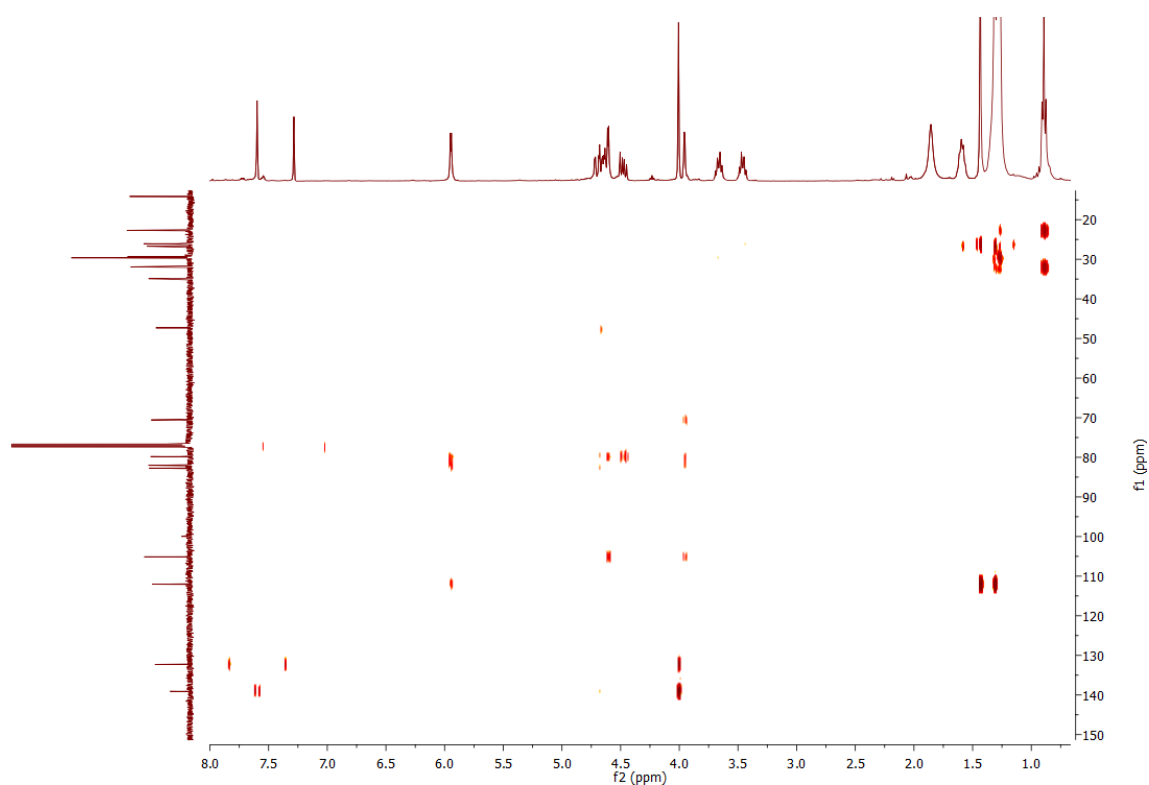
Anexo A 1.44.3. Espectro de ^{13}C -RMN



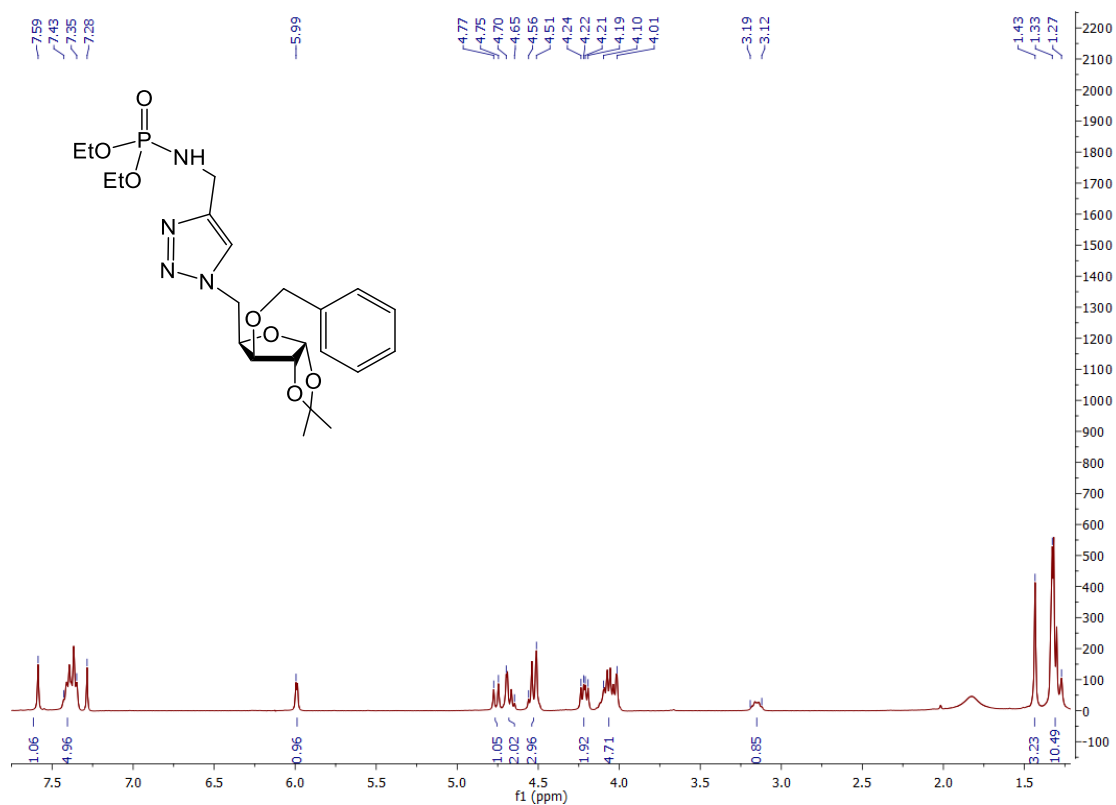
Anexo A 1.44.4. Espectro de HSQC



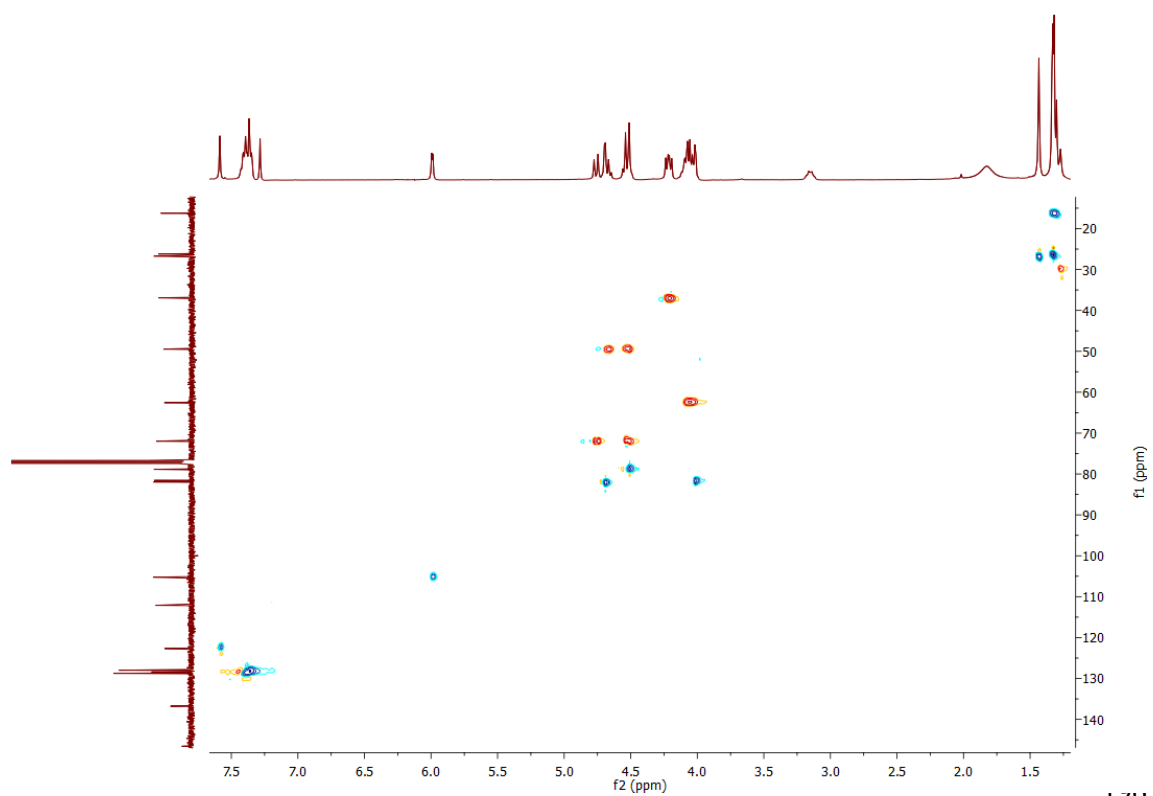
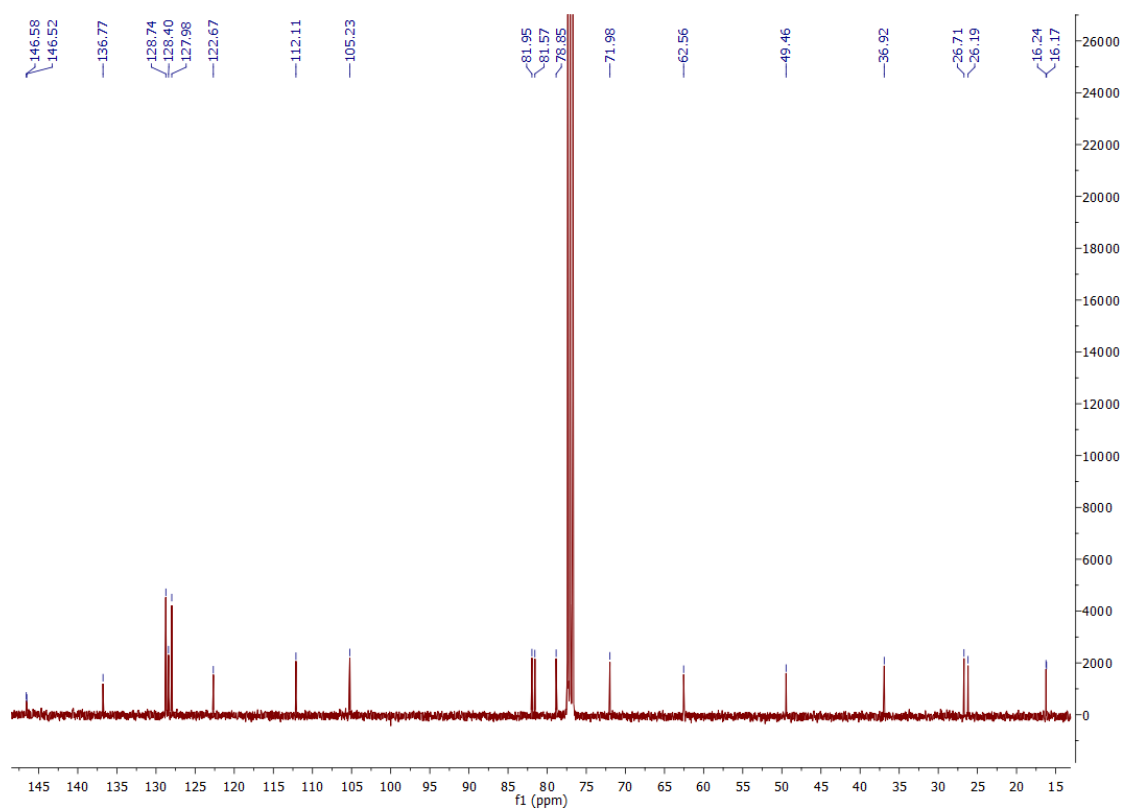
Anexo A 1.44.5. Espectro de HMBC



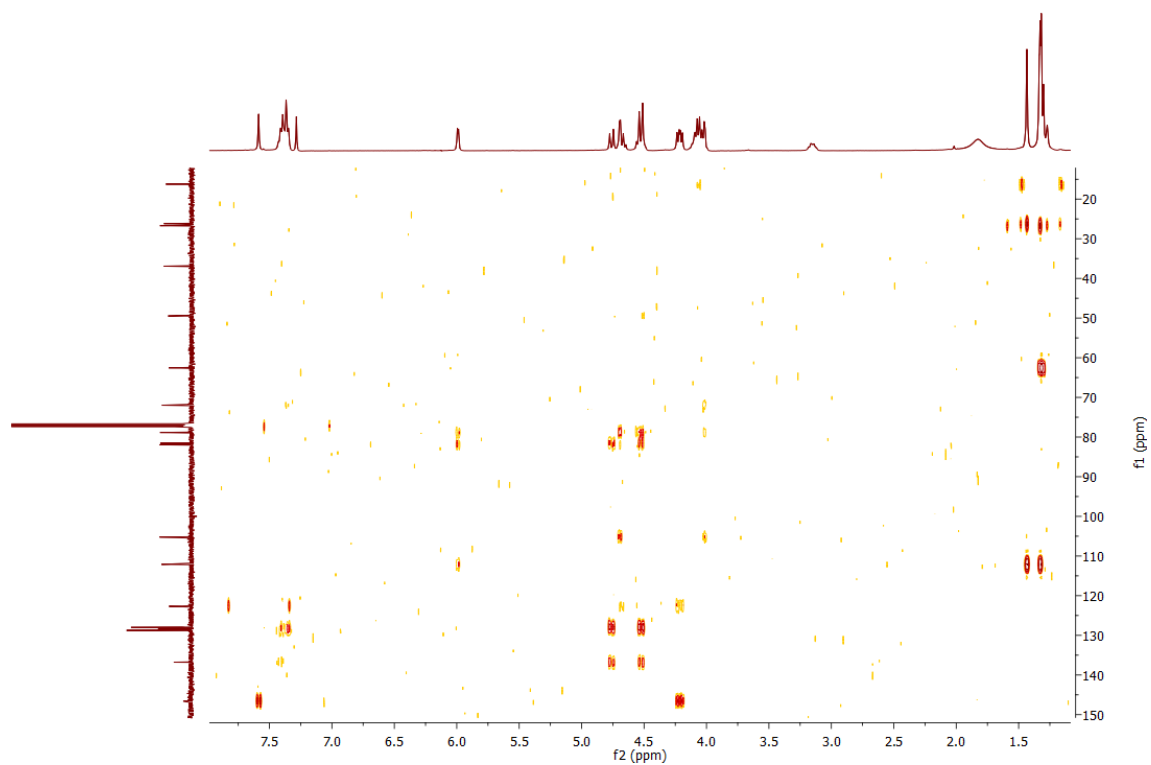
A1.45. Espectros de RMN do composto 56



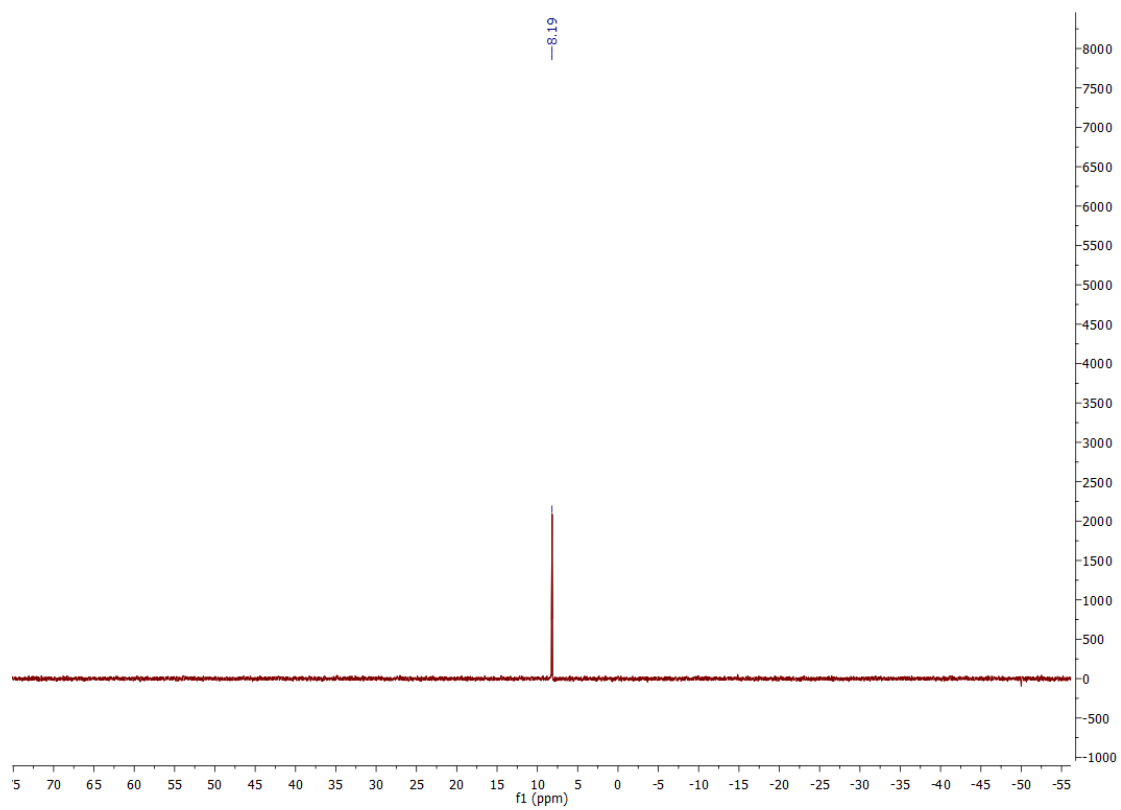
Anexo A 1.45.2. Espectro de ^{13}C -RMN



Anexo A 1.45.5. Espectro de HMBC

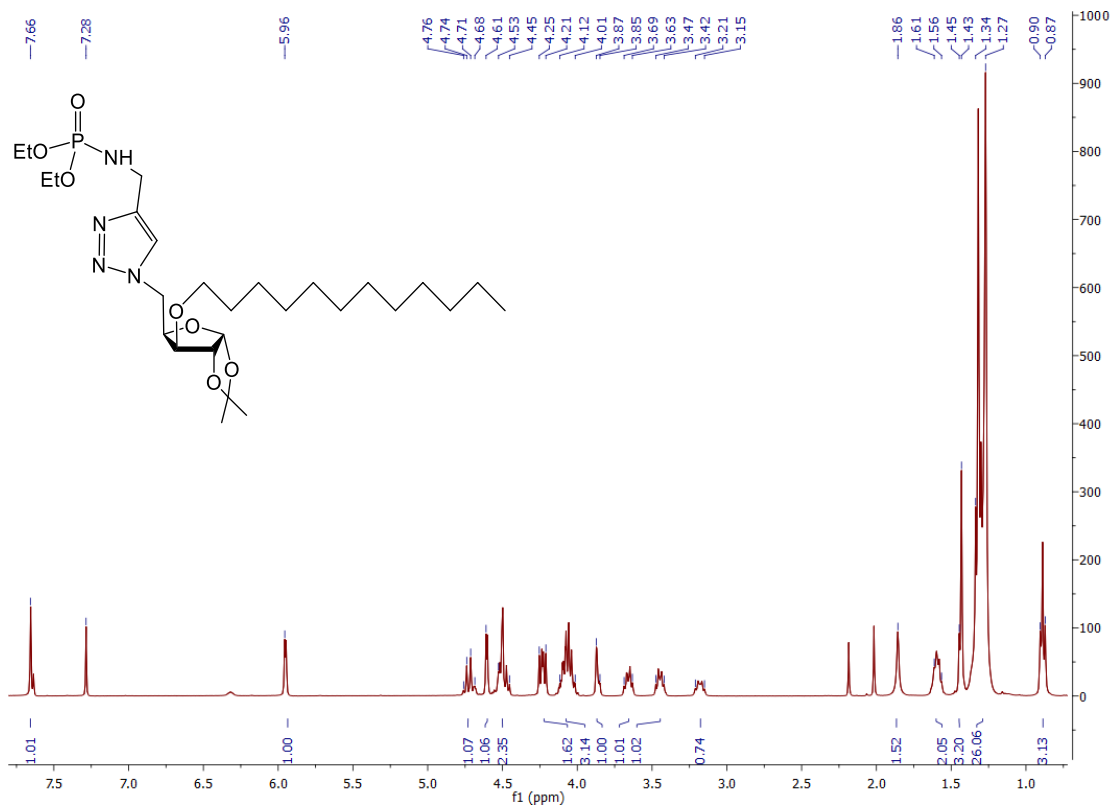


Anexo A 1.45.6. Espectro de ^{31}P -RMN

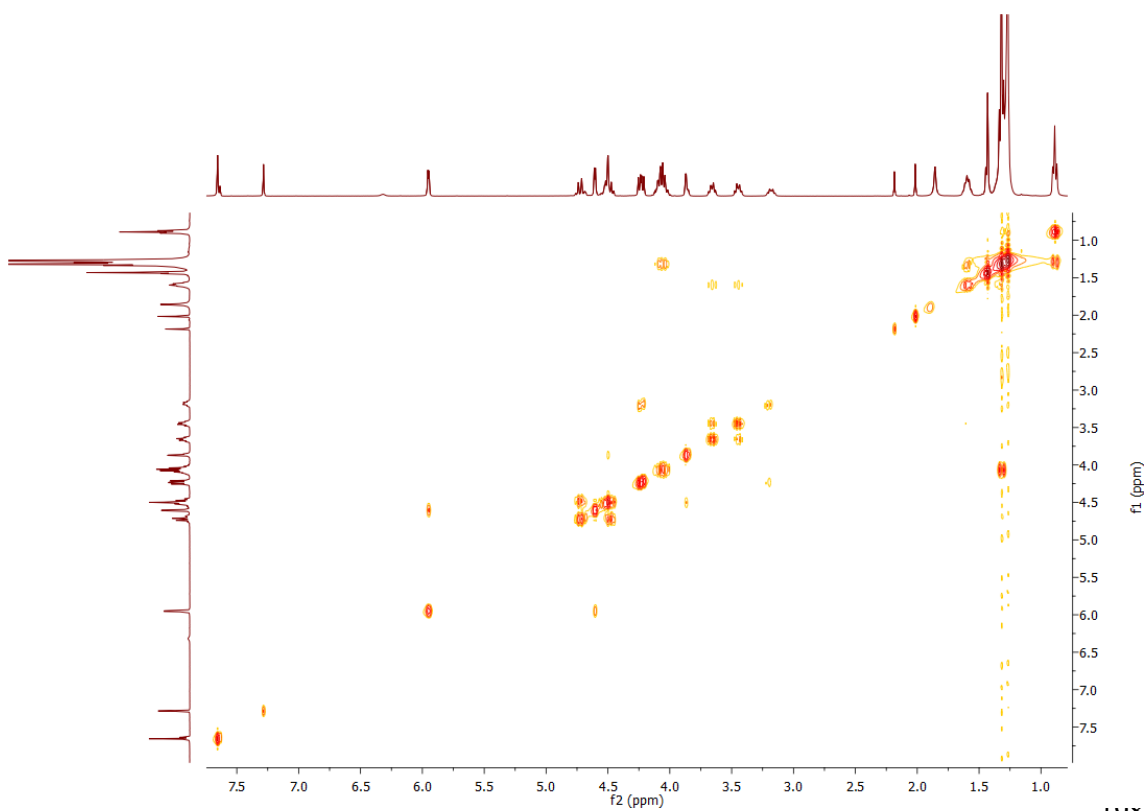


A1.46. Espectros de RMN do composto 57

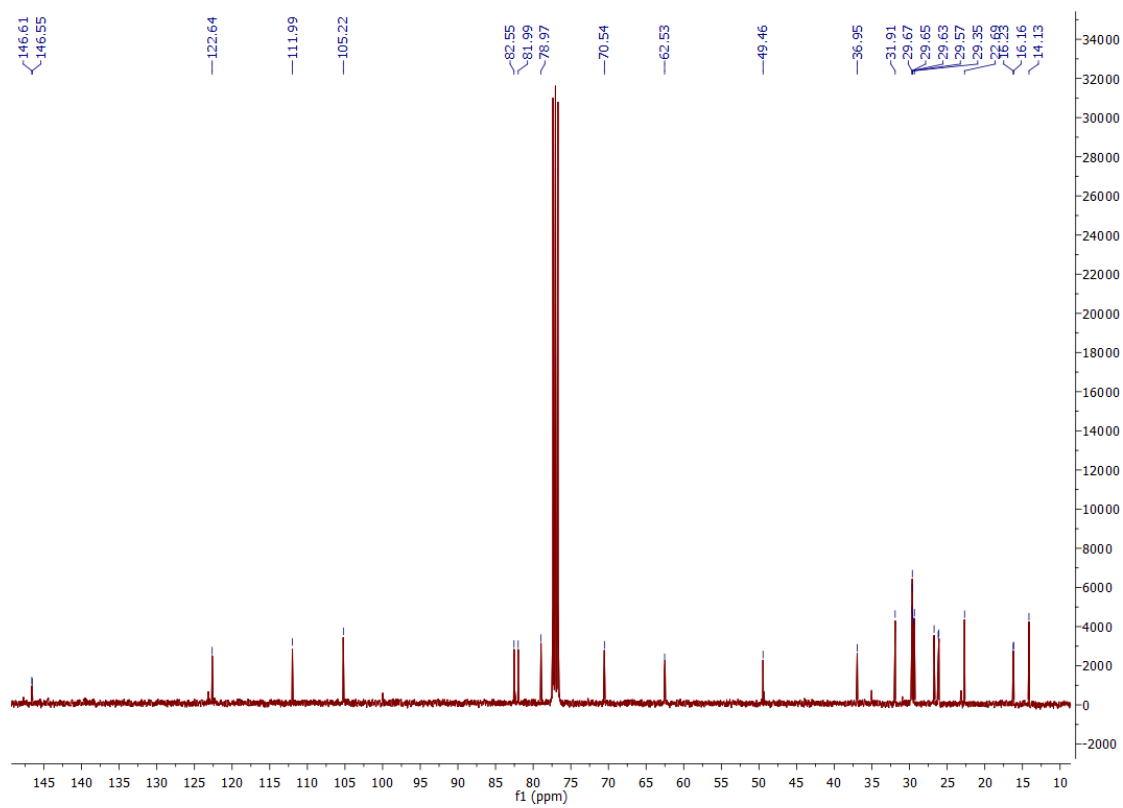
Anexo A 1.46.1. Espectro de ^1H -RMN



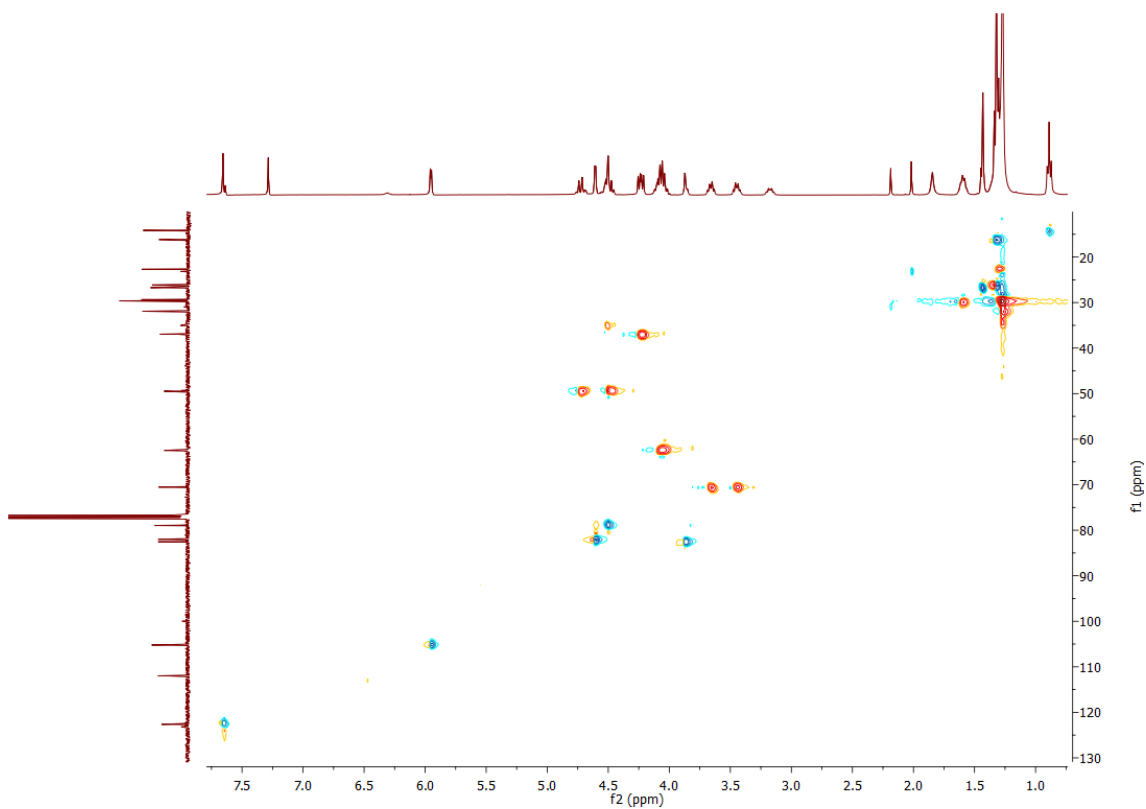
Anexo A 1.46.2. Espectro de COSY



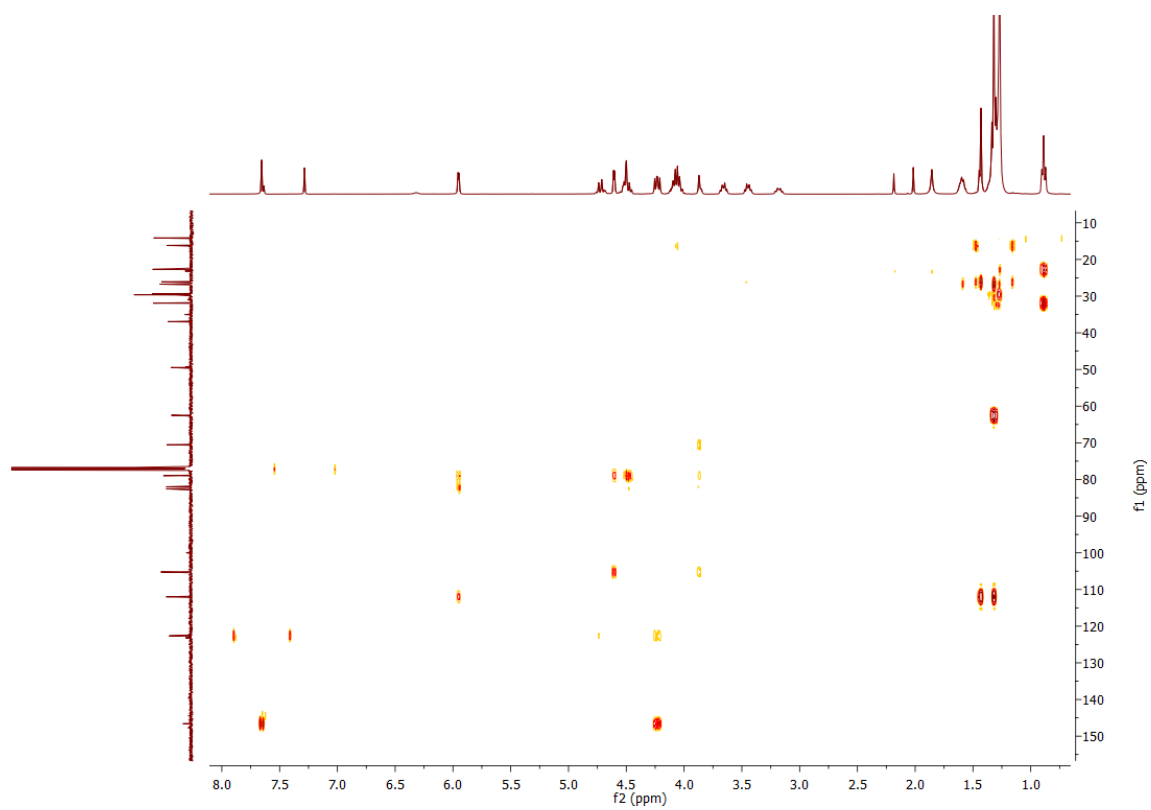
Anexo A 1.46.3. Espectro de ^{13}C -RMN



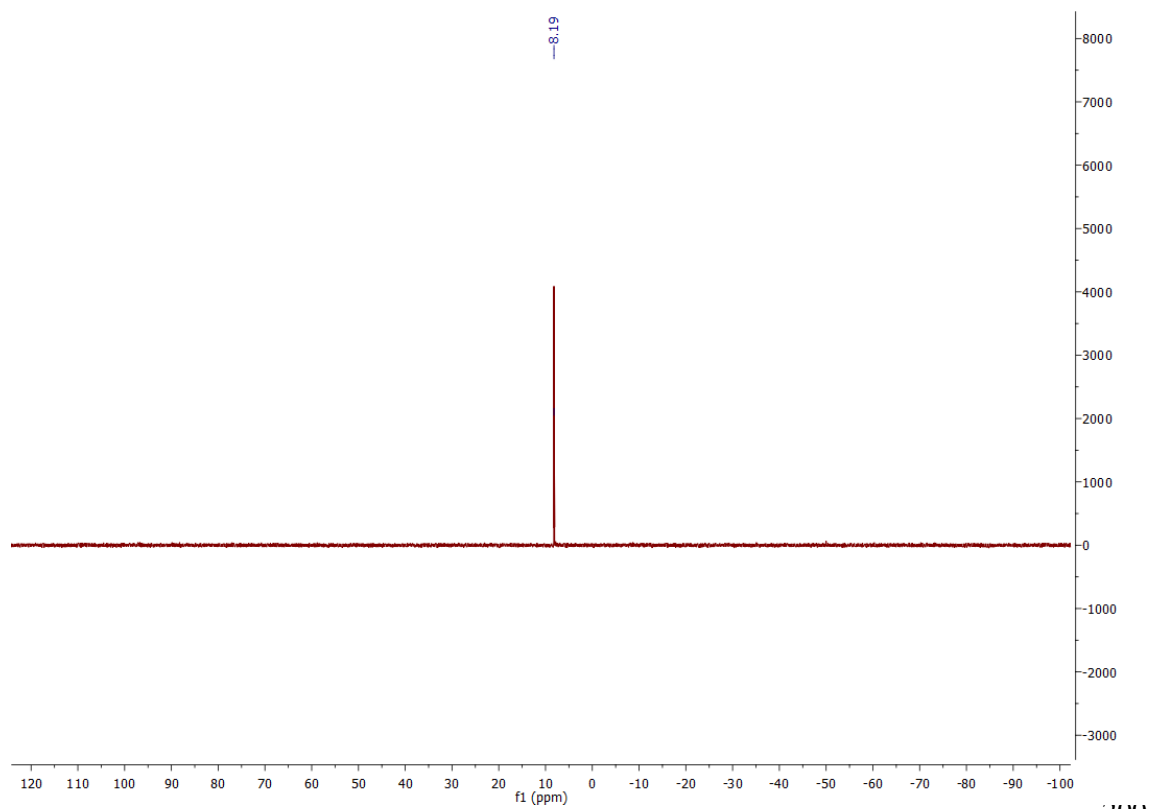
Anexo A 1.46.4. Espectro de HSQC



Anexo A 1.46.5. Espectro de HMBC

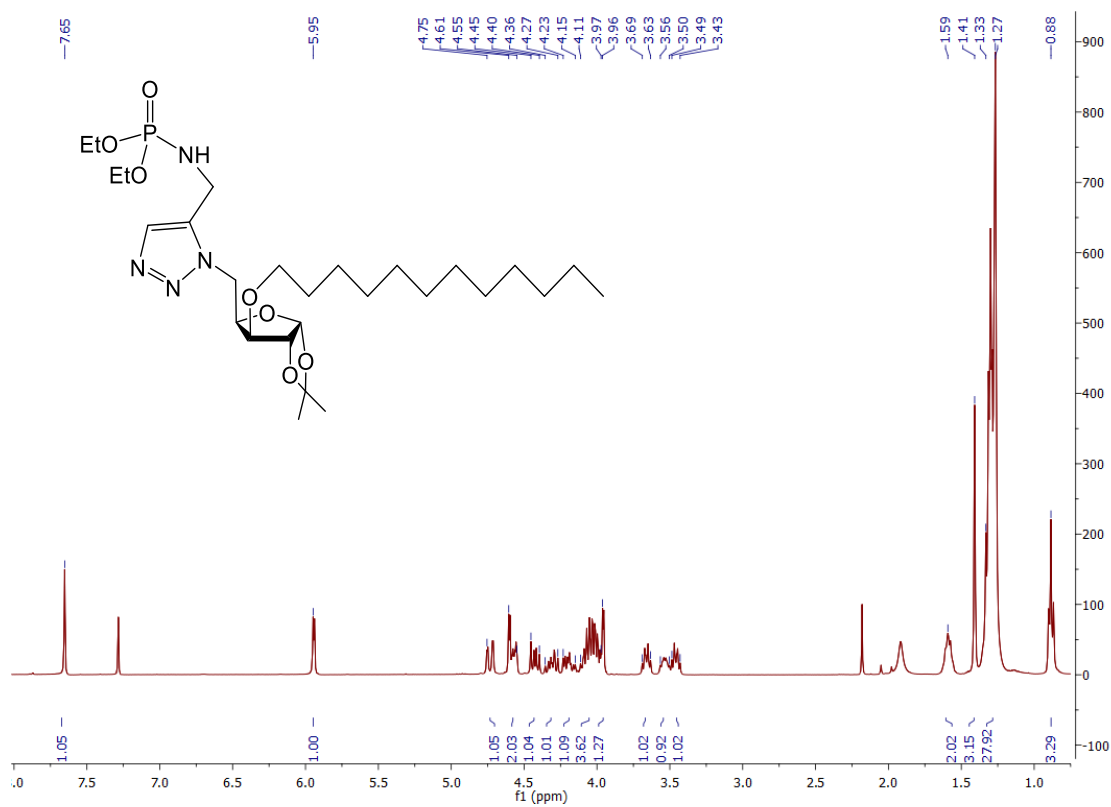


Anexo A 1.46.6. Espectro de ^{31}P -RMN

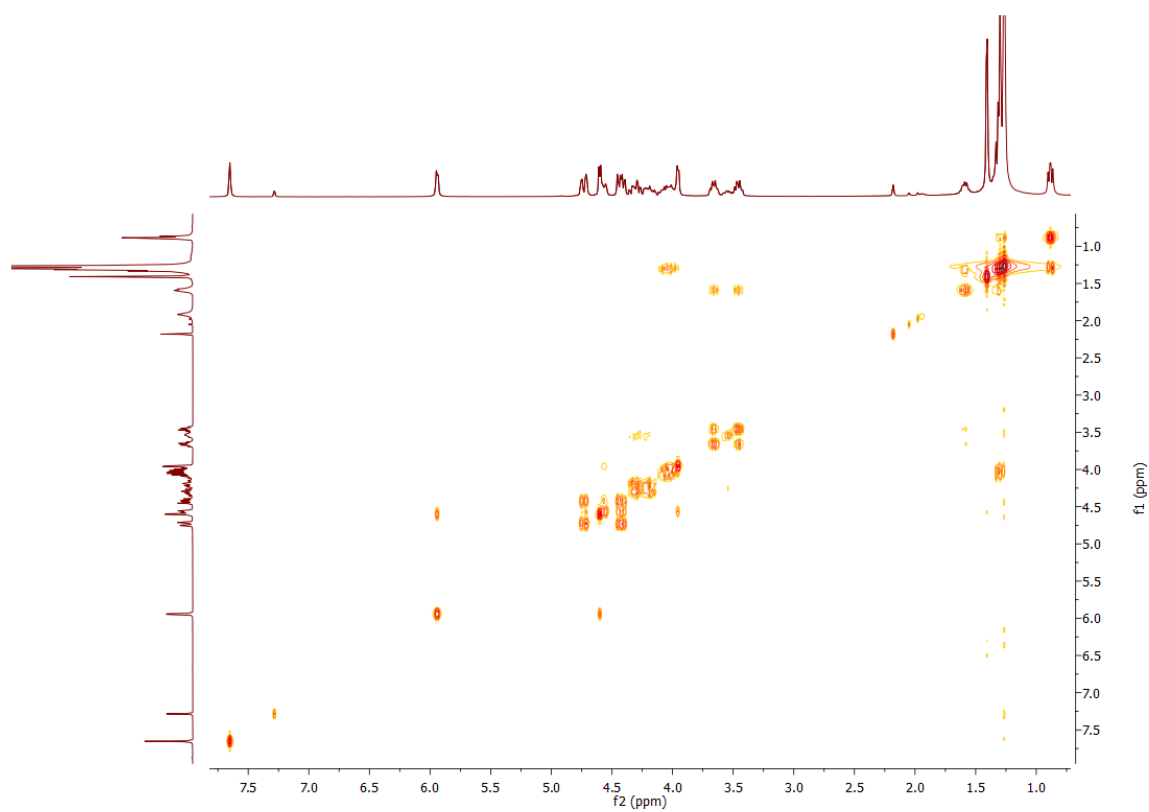


A1.47. Espetros de RMN do composto 58

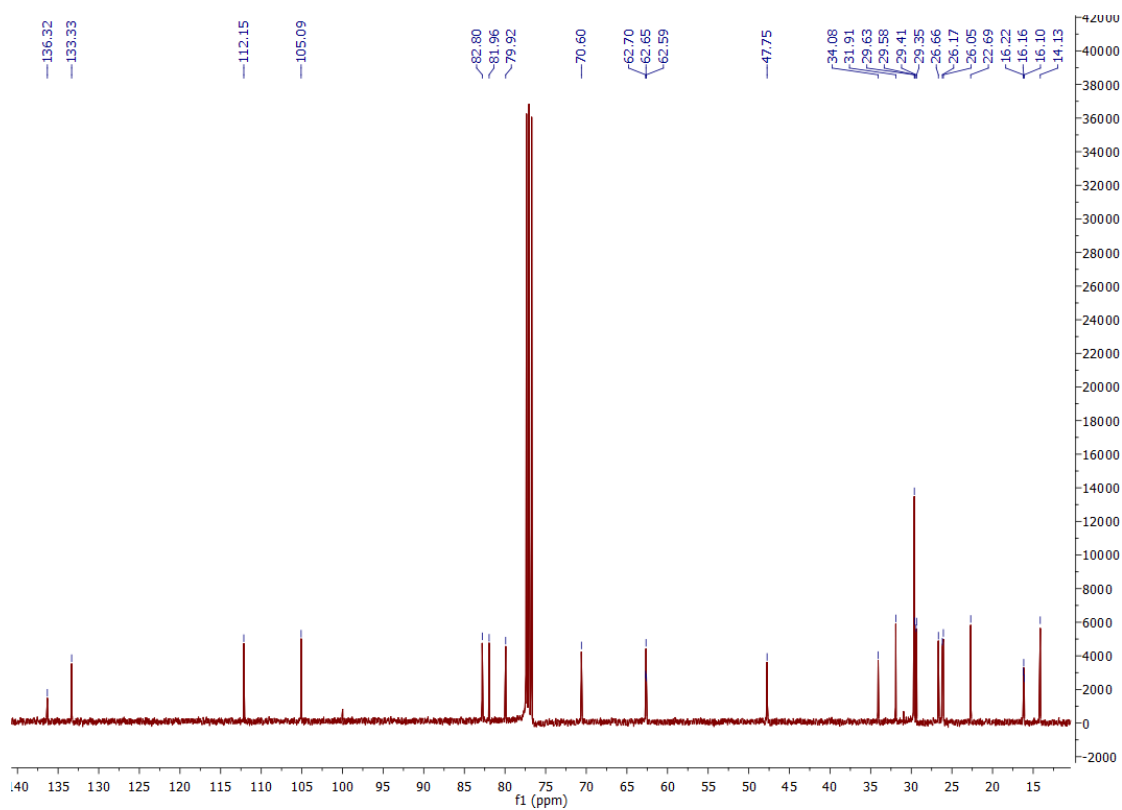
Anexo A 1.47.1. Espetro de ^1H -RMN



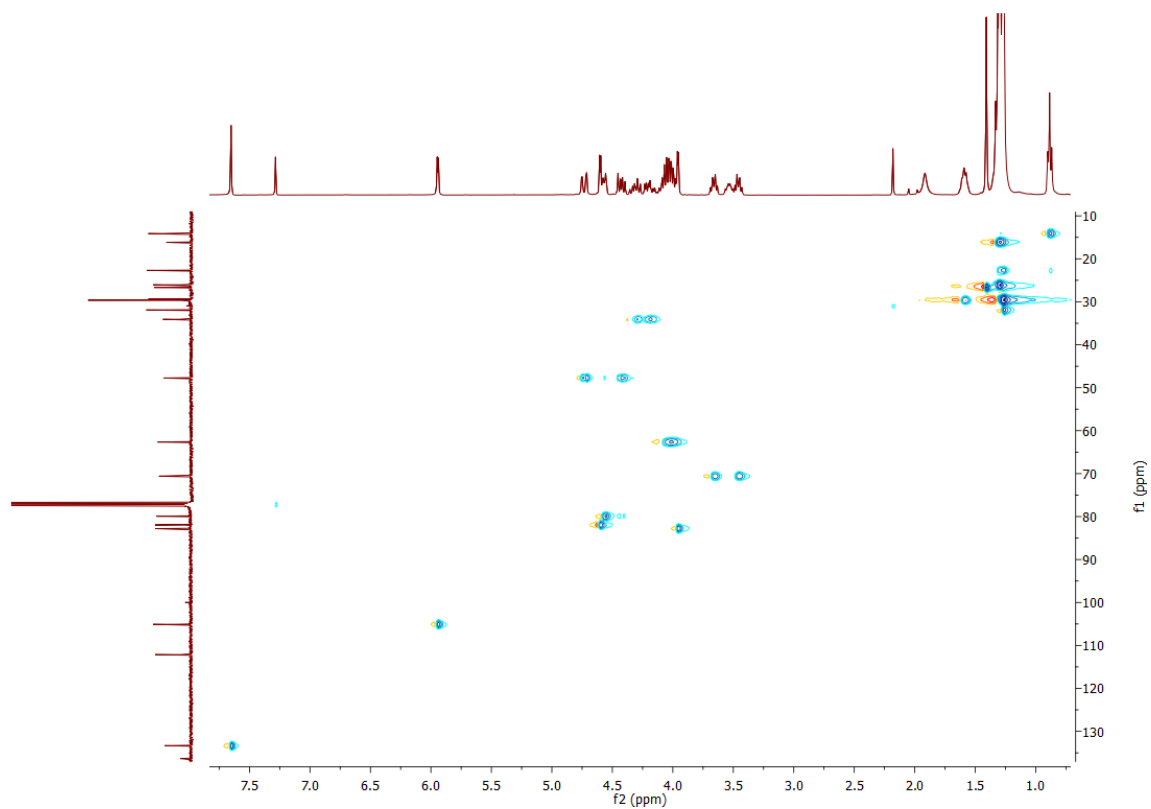
Anexo A 1.47.2. Espetro de COSY



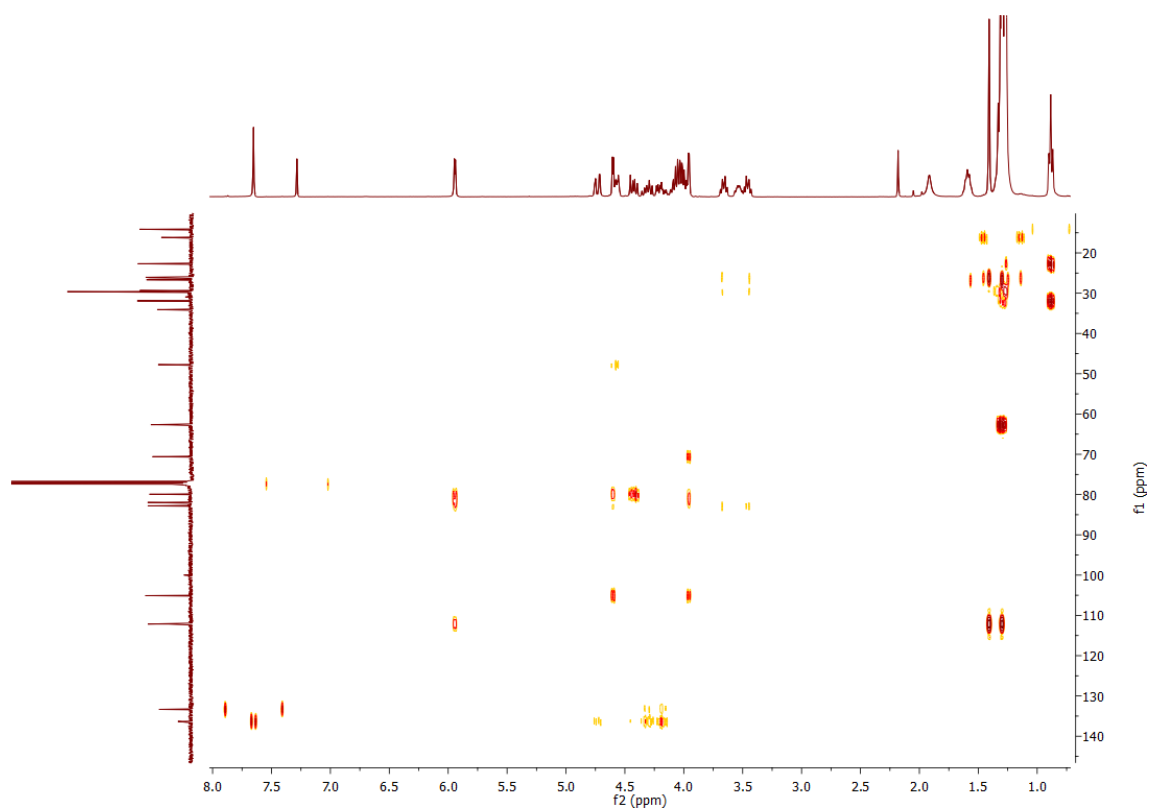
Anexo A 1.47.3. Espectro de ^{13}C -RMN



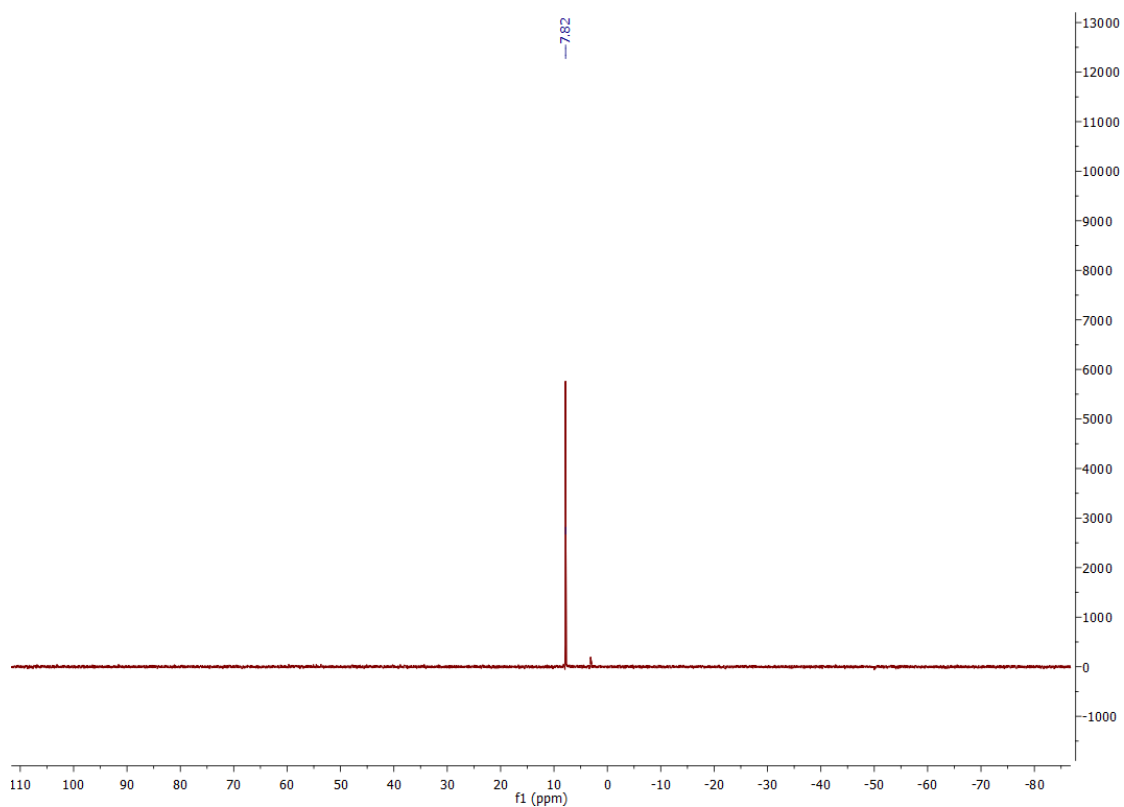
Anexo A 1.47.4. Espectro de HSQC



Anexo A 1.47.5. Espectro de HMBC

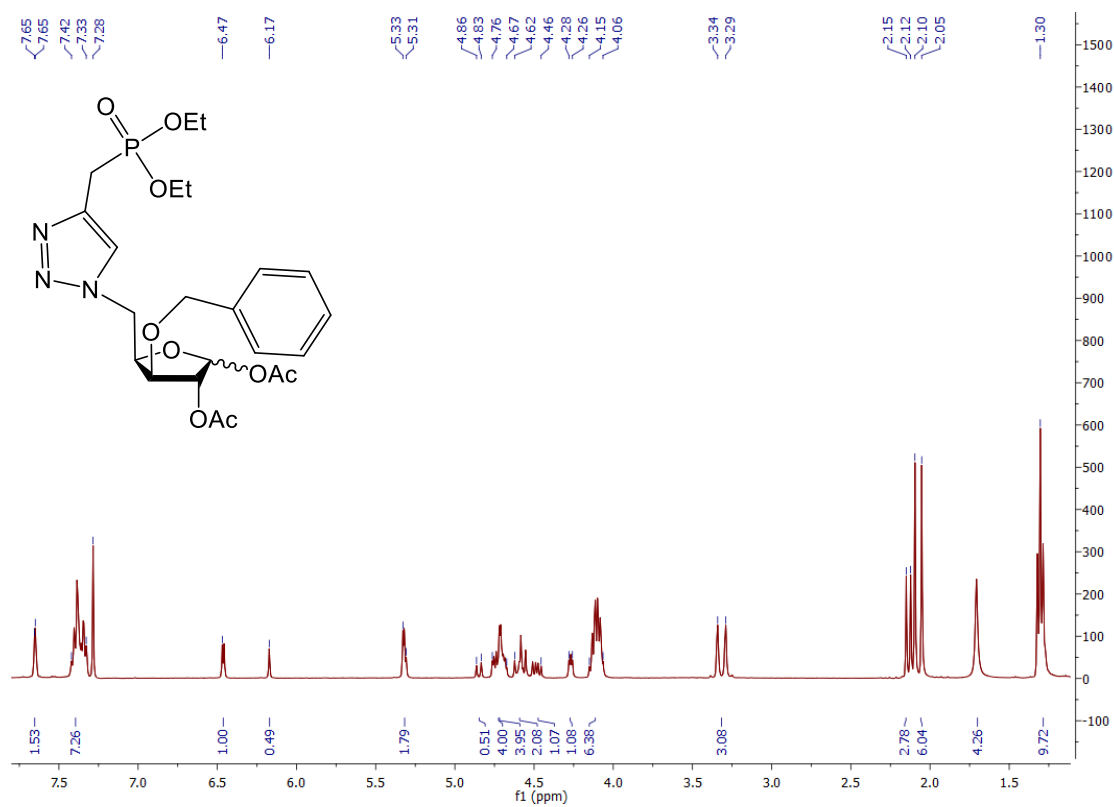


Anexo A 1.47.6. Espectro de ^{31}P -RMN

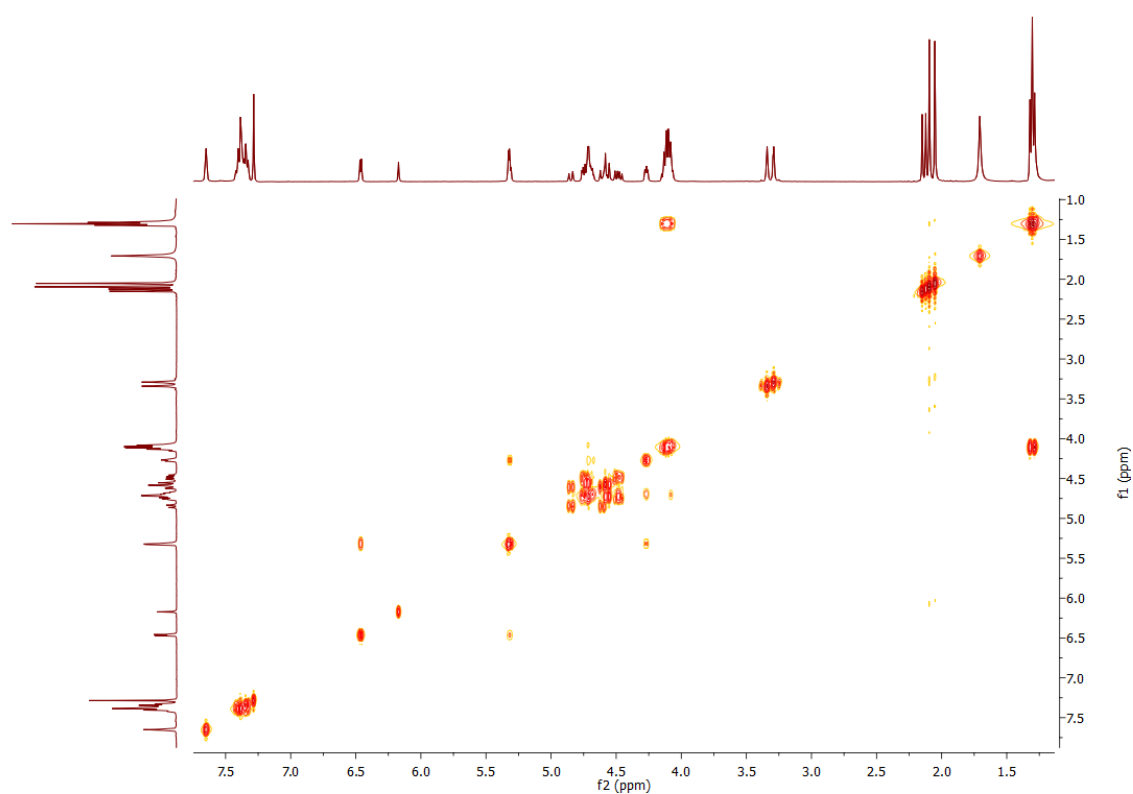


A1.48. Espectros de RMN do composto 59

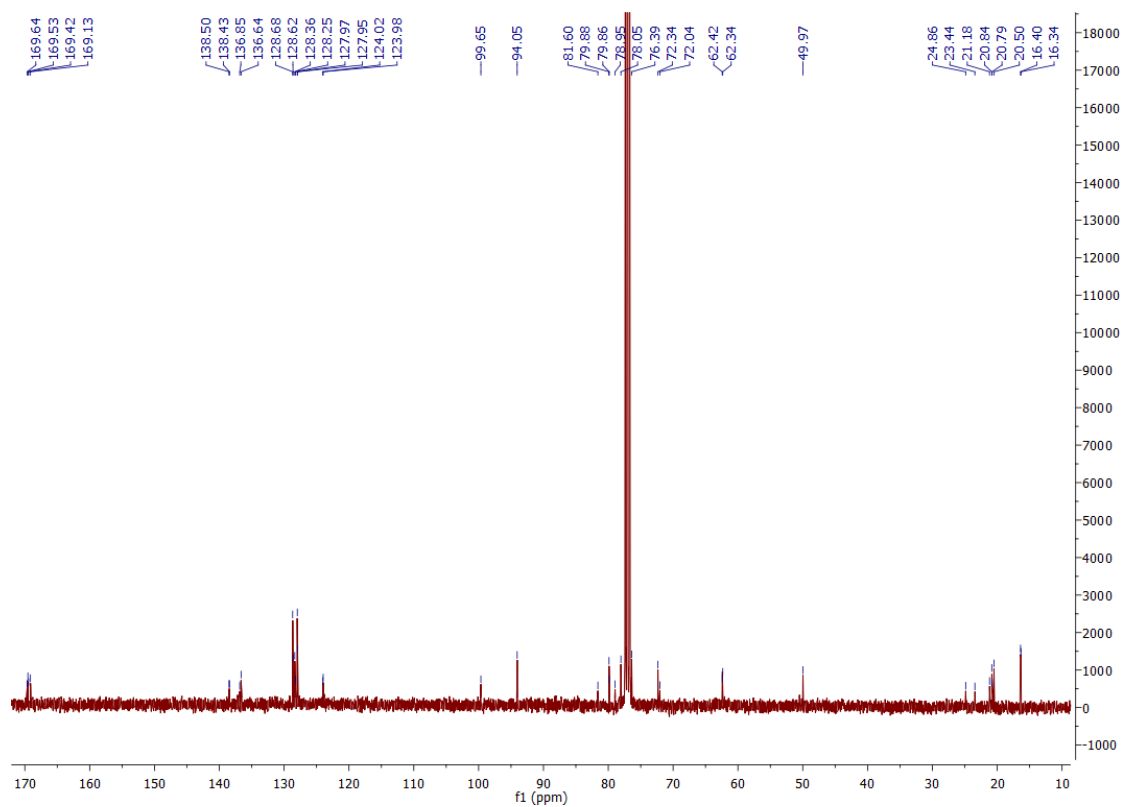
Anexo A 1.48.1. Espectro de ^1H -RMN



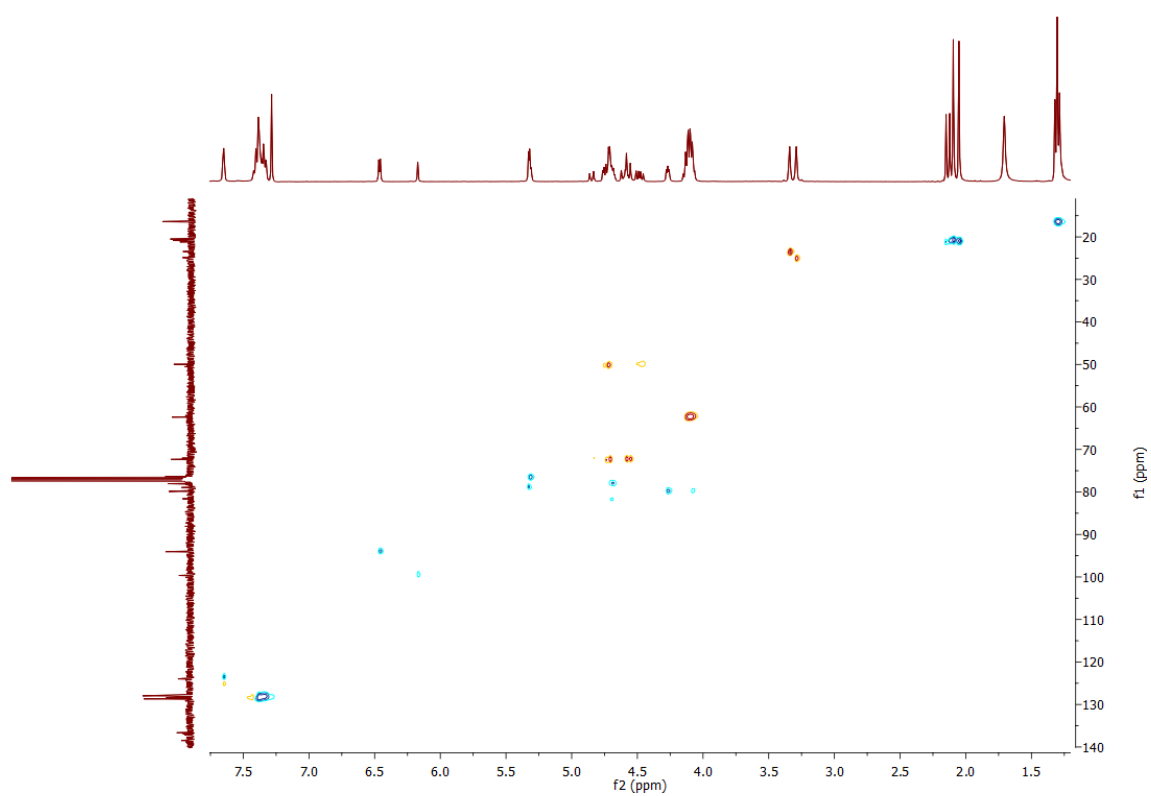
Anexo A 1.48.2. Espectro de COSY



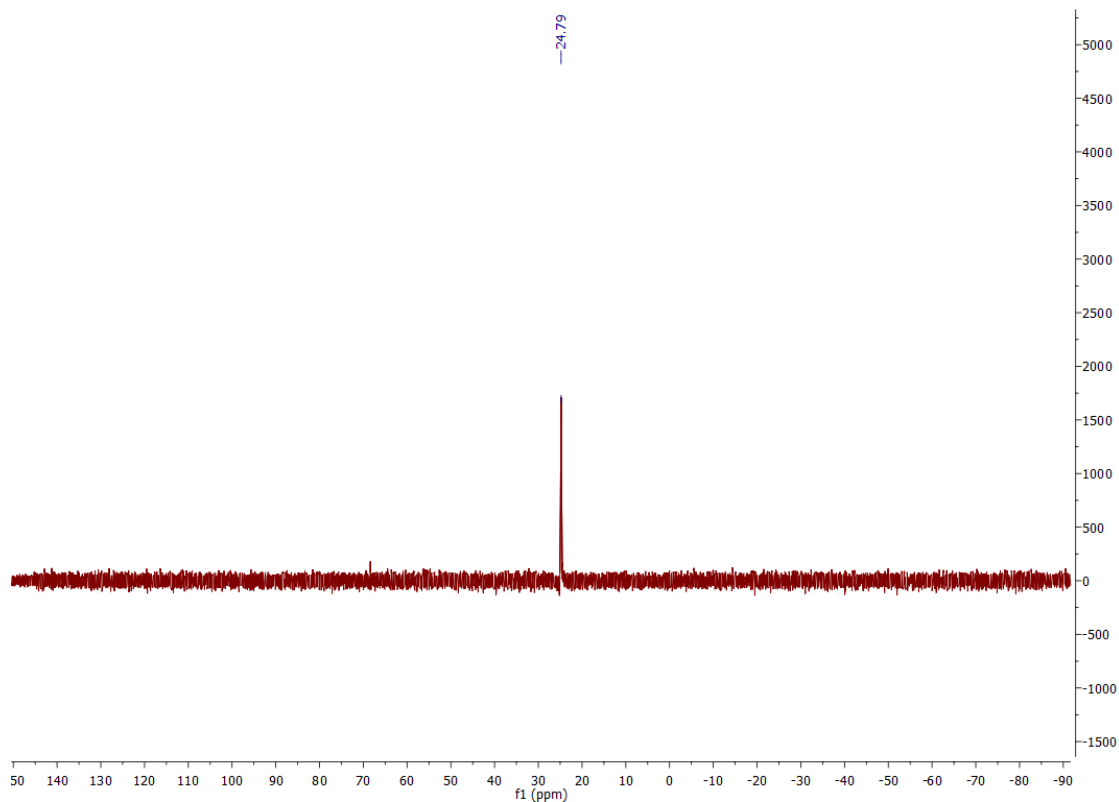
Anexo A 1.48.3. Espectro de ^{13}C -RMN



Anexo A 1.48.4. Espectro de HSQC

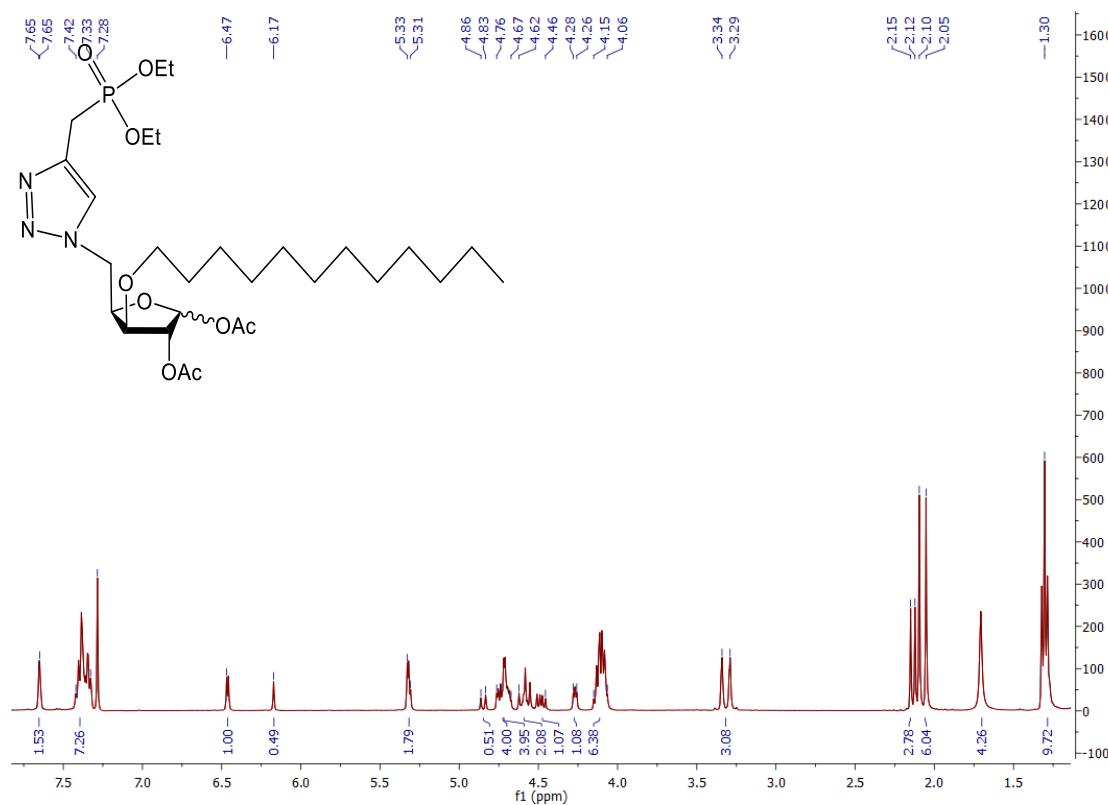


Anexo A 1.48.5. Espectro de ^{31}P -RMN

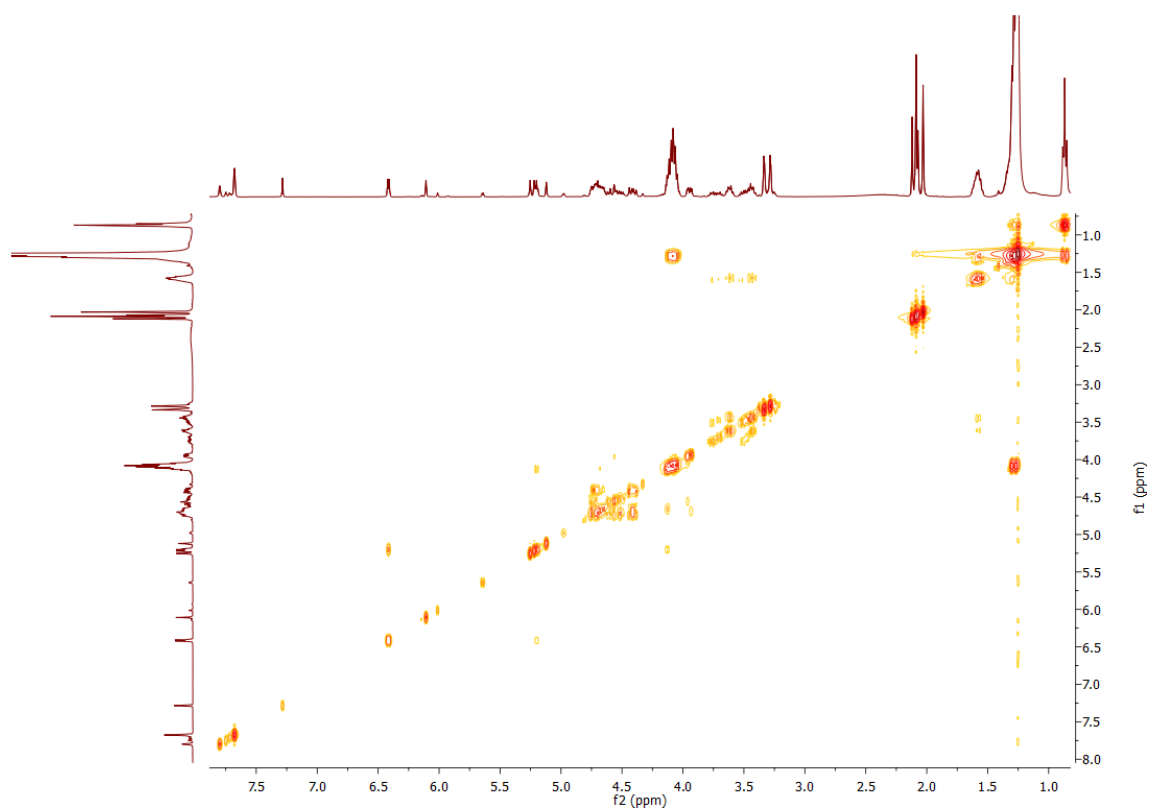


A1.49. Espectros de RMN do composto 60

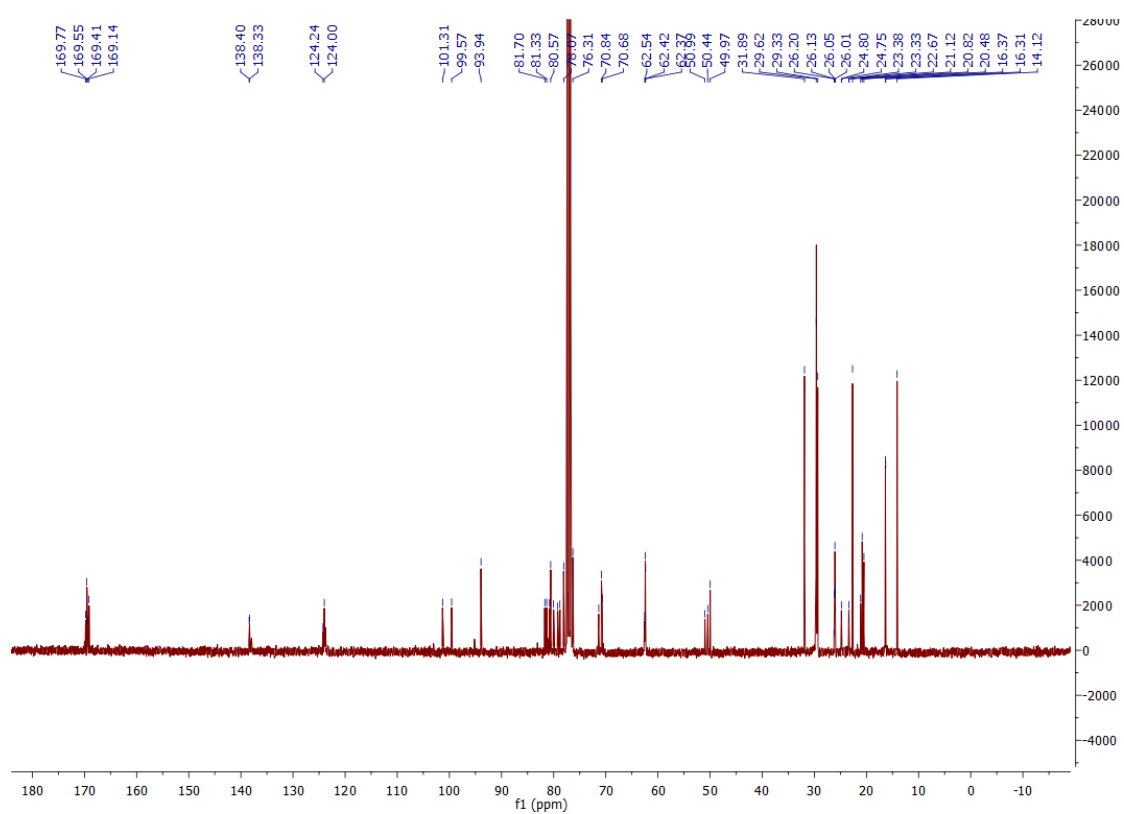
Anexo A 1.49.1. Espectro de ^1H -RMN



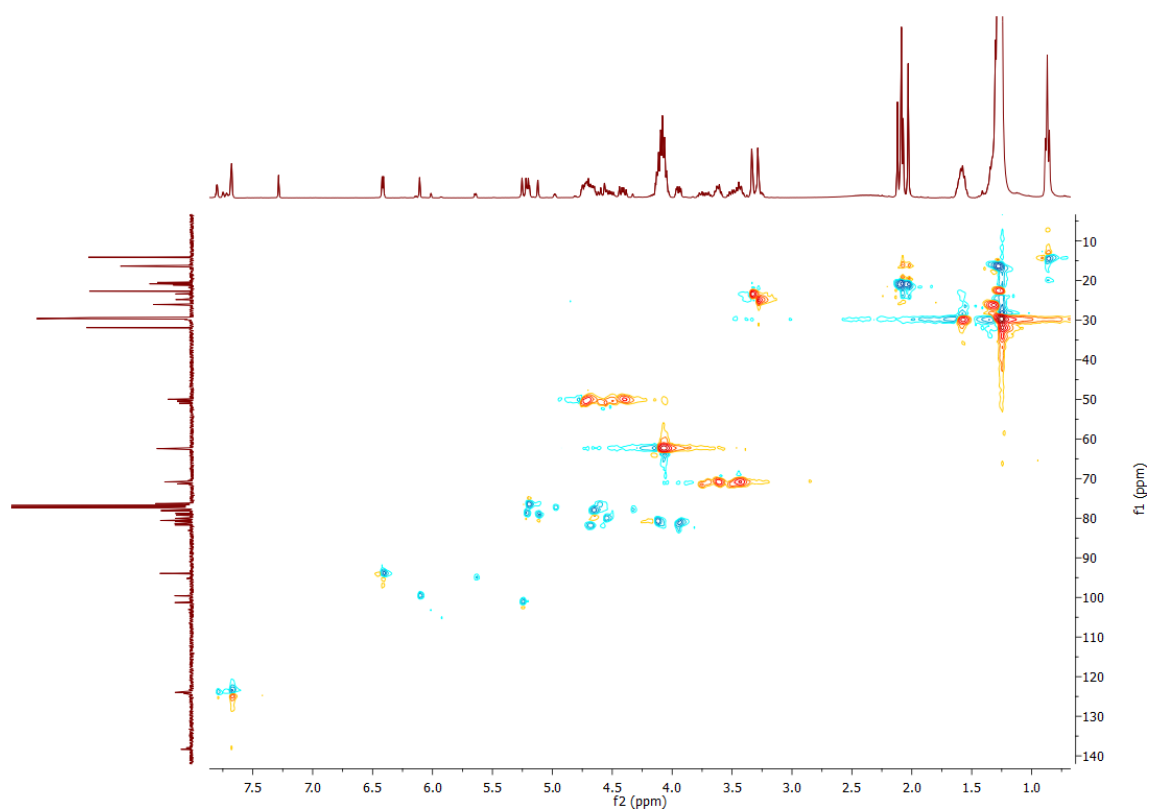
Anexo A 1.49.2. Espectro de COSY



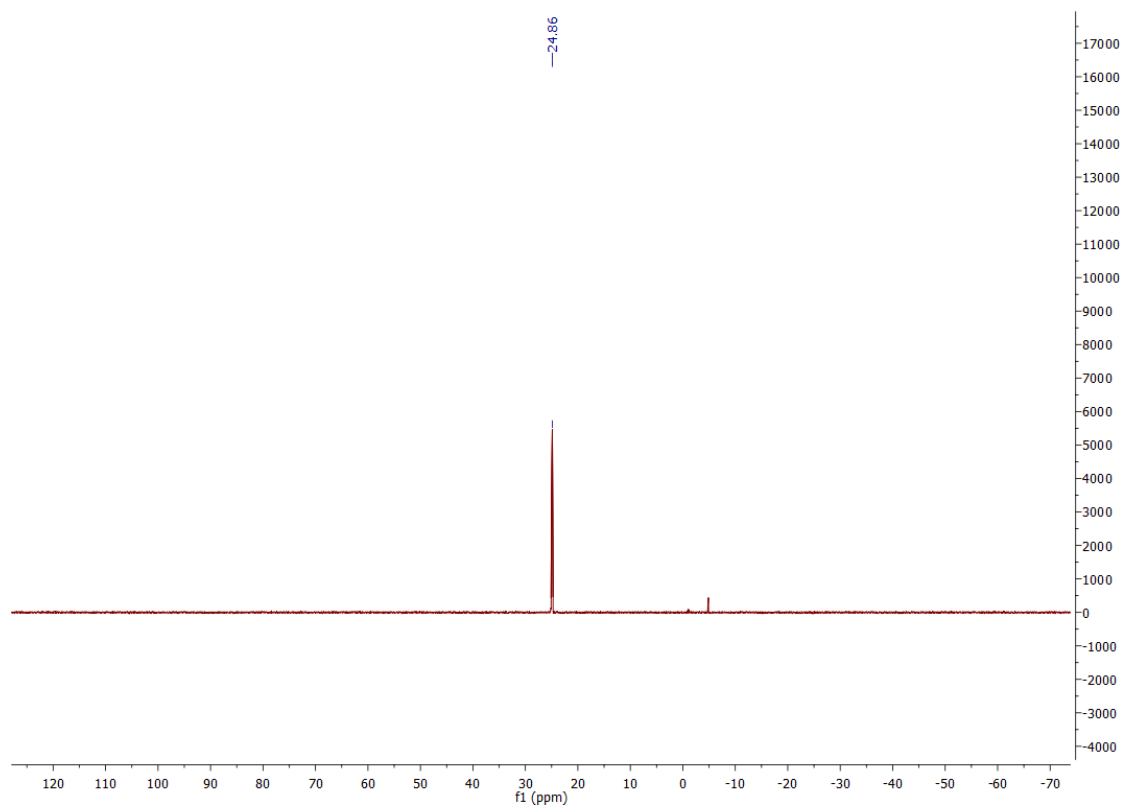
Anexo A 1.49.3. Espectro de ^{13}C -RMN



Anexo A 1.49.4. Espectro de HSQC

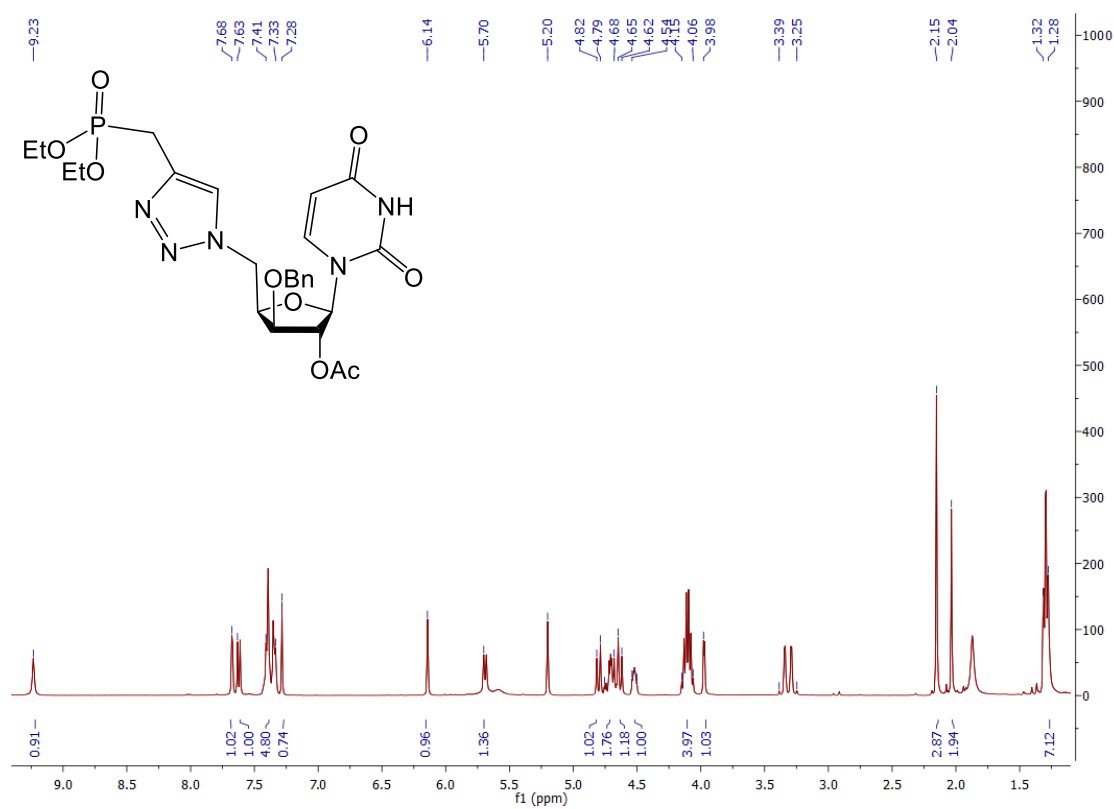


Anexo A 1.48.5. Espectro de ^{31}P -RMN

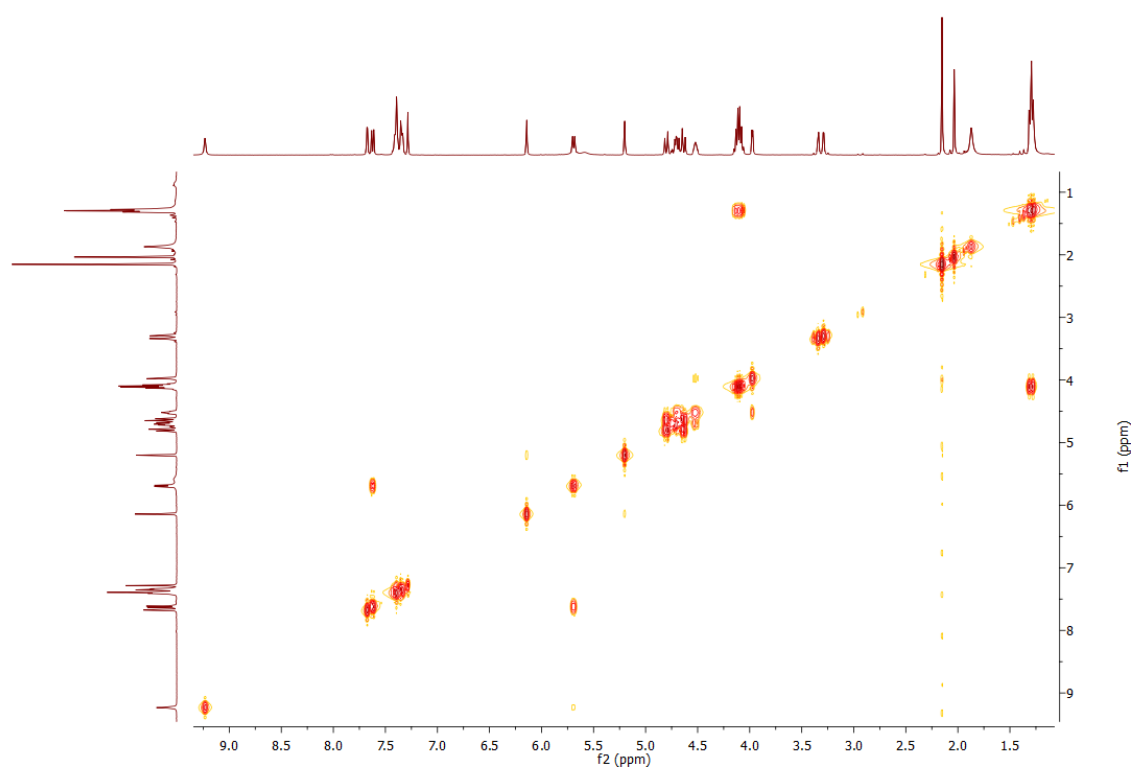


A1.50. Espectros de RMN do composto 61

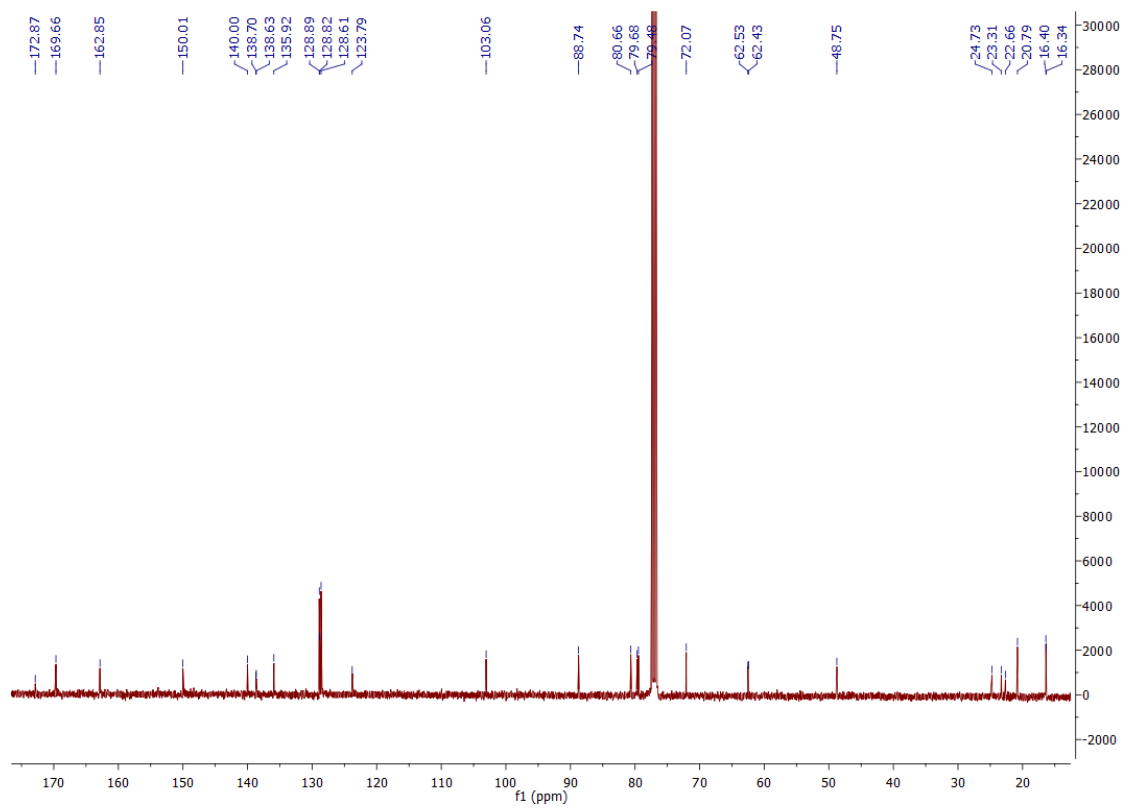
Anexo A 1.50.1. Espectro de ^1H -RMN



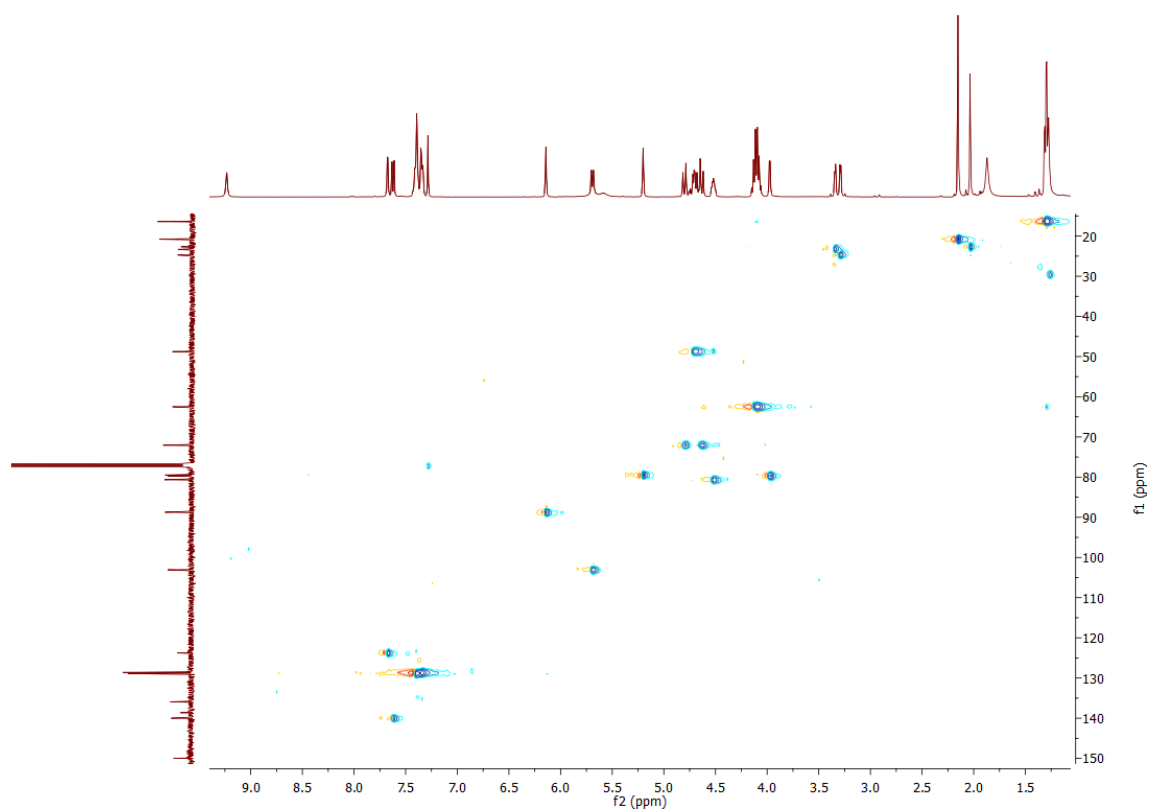
Anexo A 1.50.2. Espectro de COSY



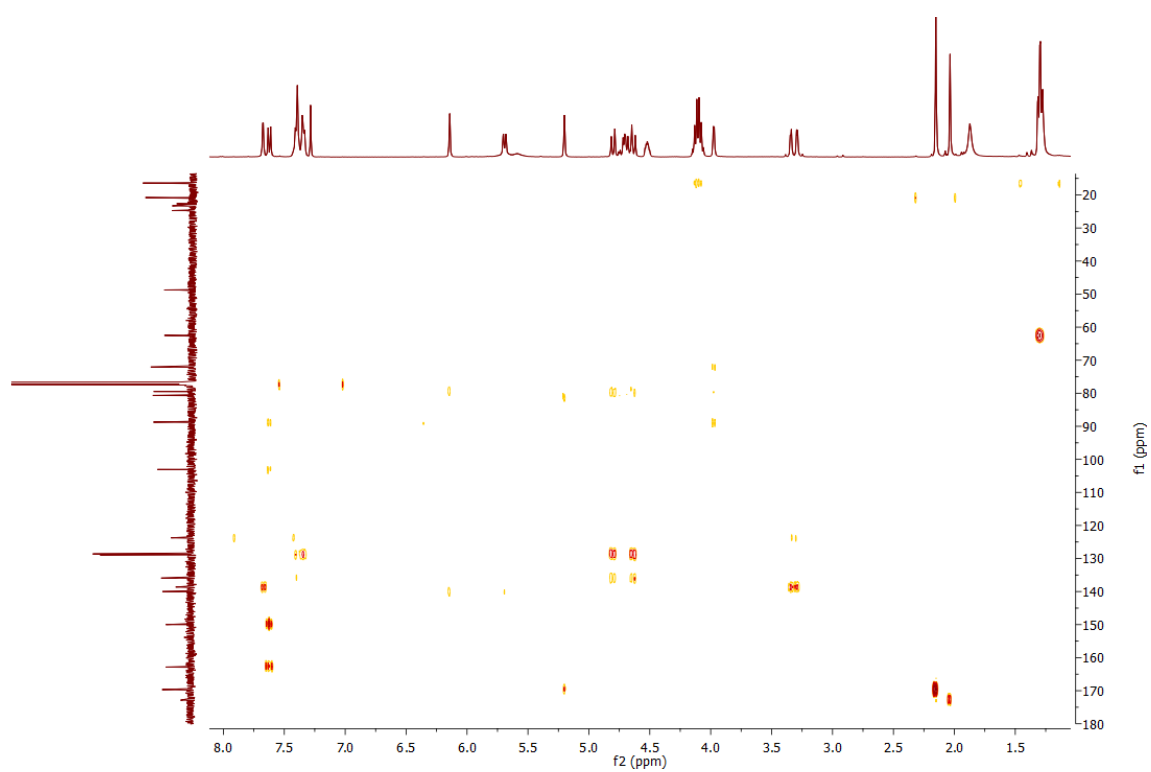
Anexo A 1.50.3. Espectro de ^{13}C -RMN



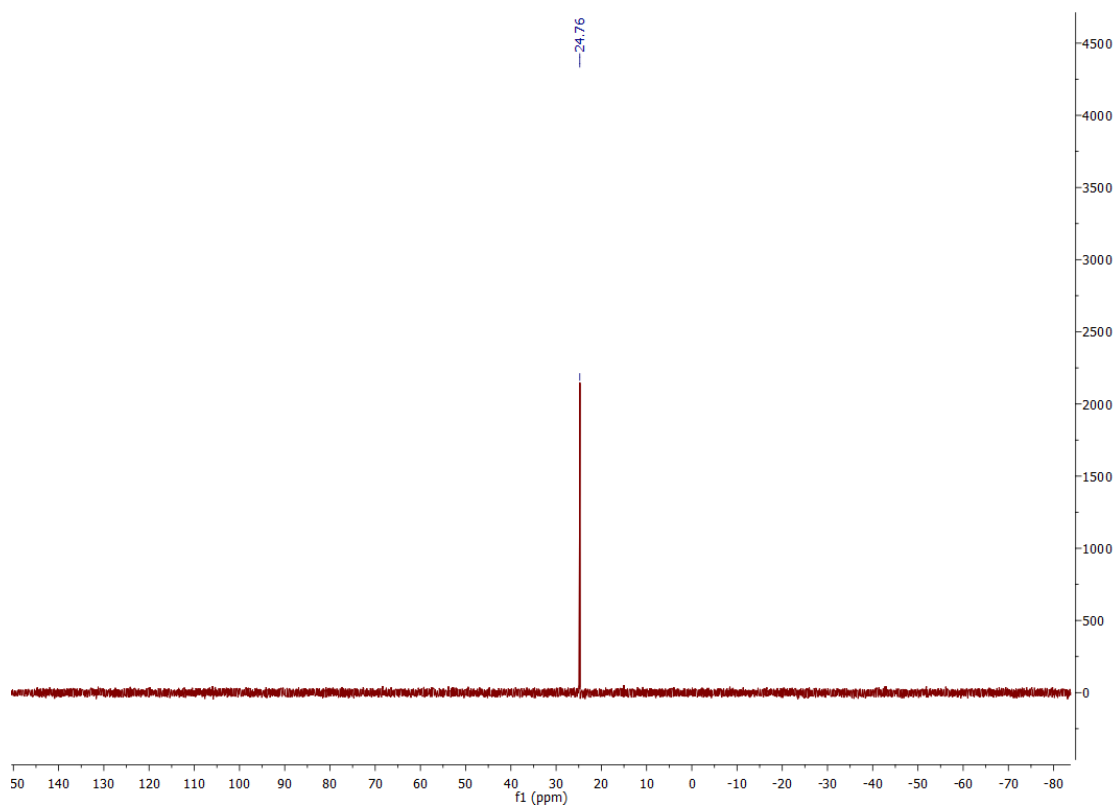
Anexo A 1.50.4. Espectro de HSQC



Anexo A 1.50.5. Espectro de HMBC

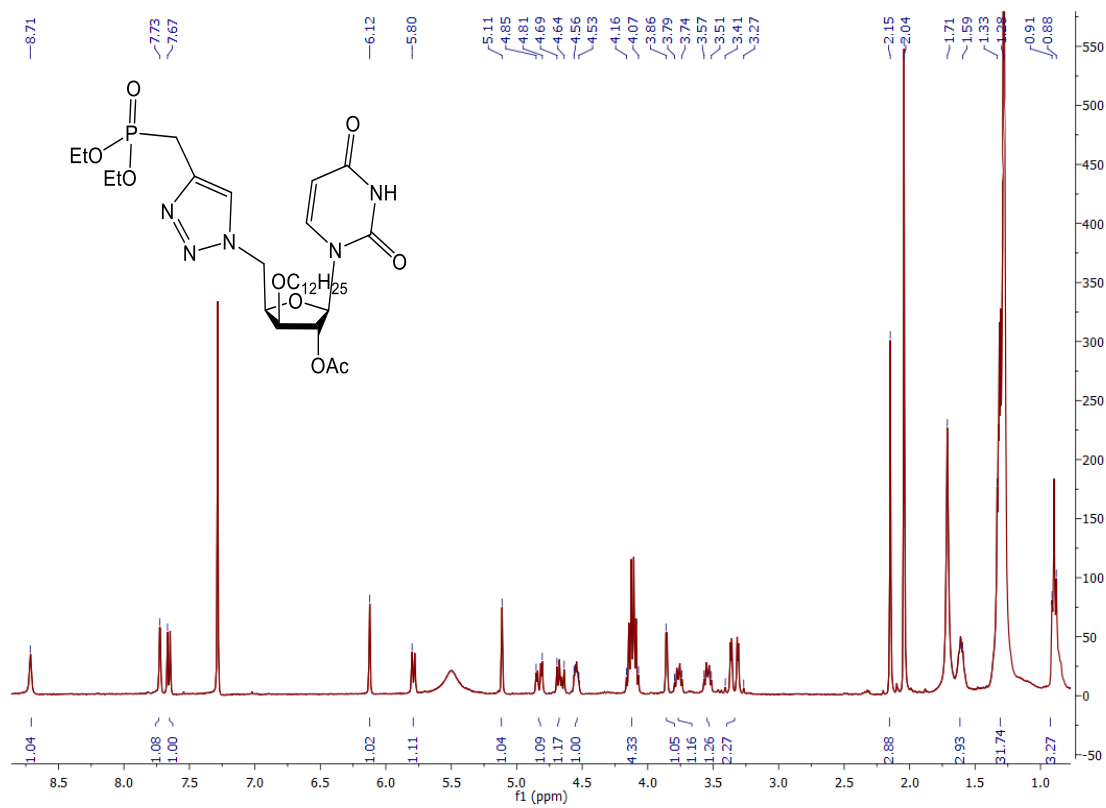


Anexo A 1.50.6. Espectro de ^{31}P -RMN

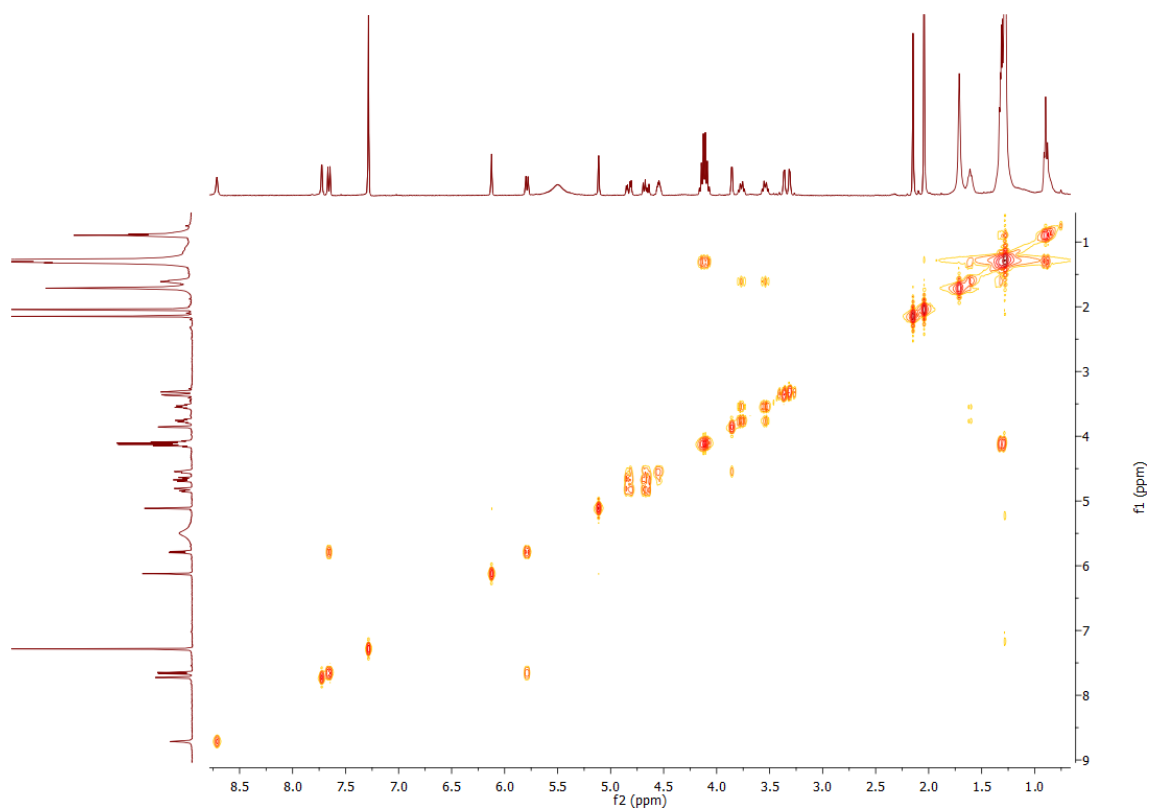


A1.51. Espectros de RMN do composto 62

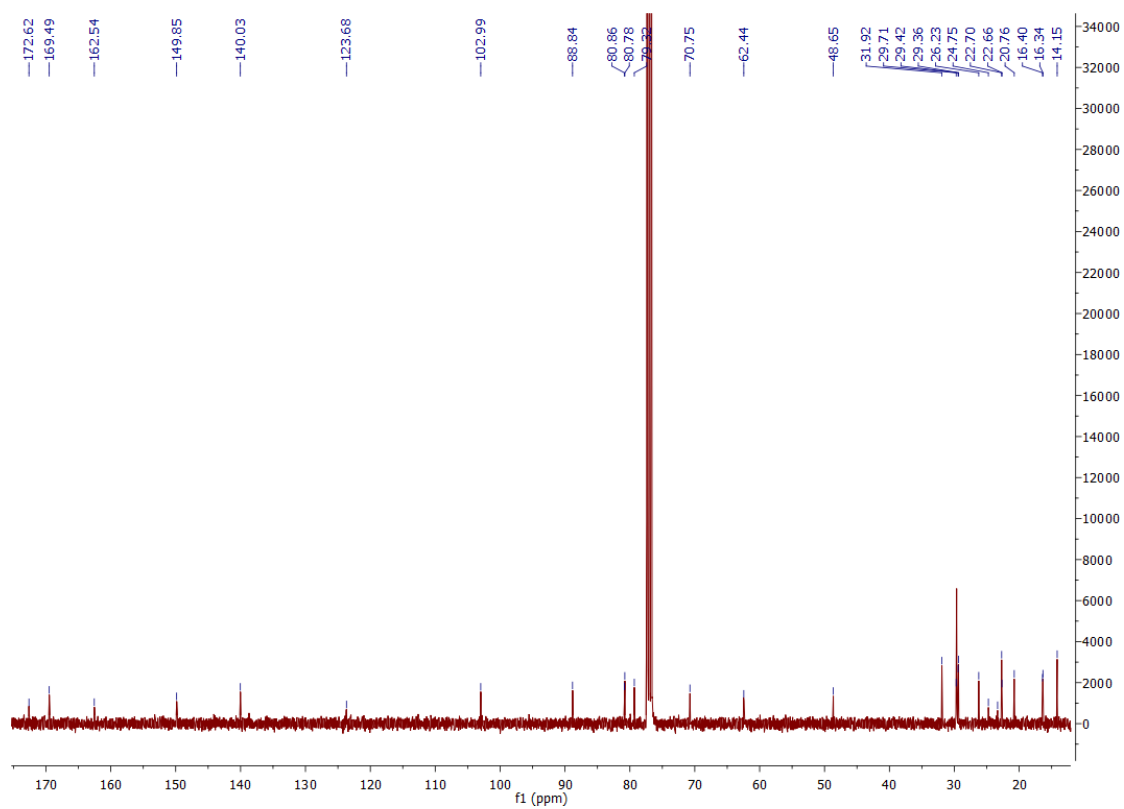
Anexo A 1.51.1. Espectro de ^1H -RMN



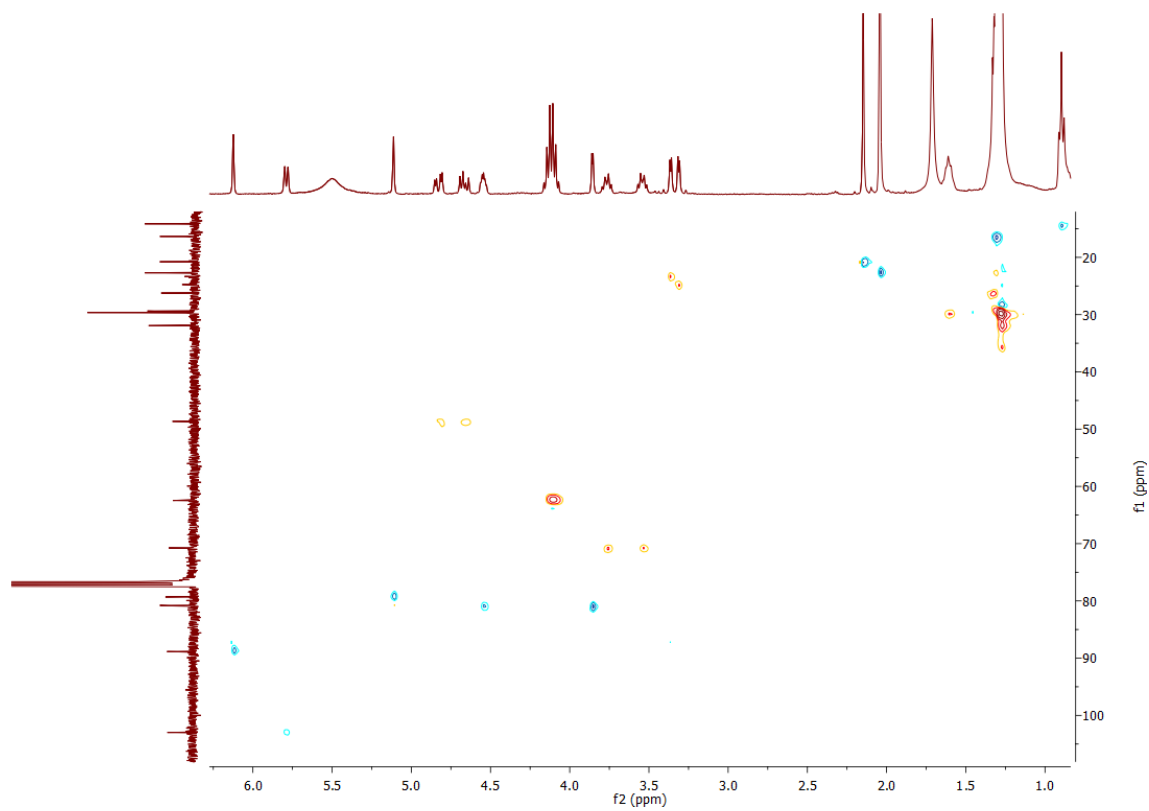
Anexo A 1.51.2. Espectro de COSY



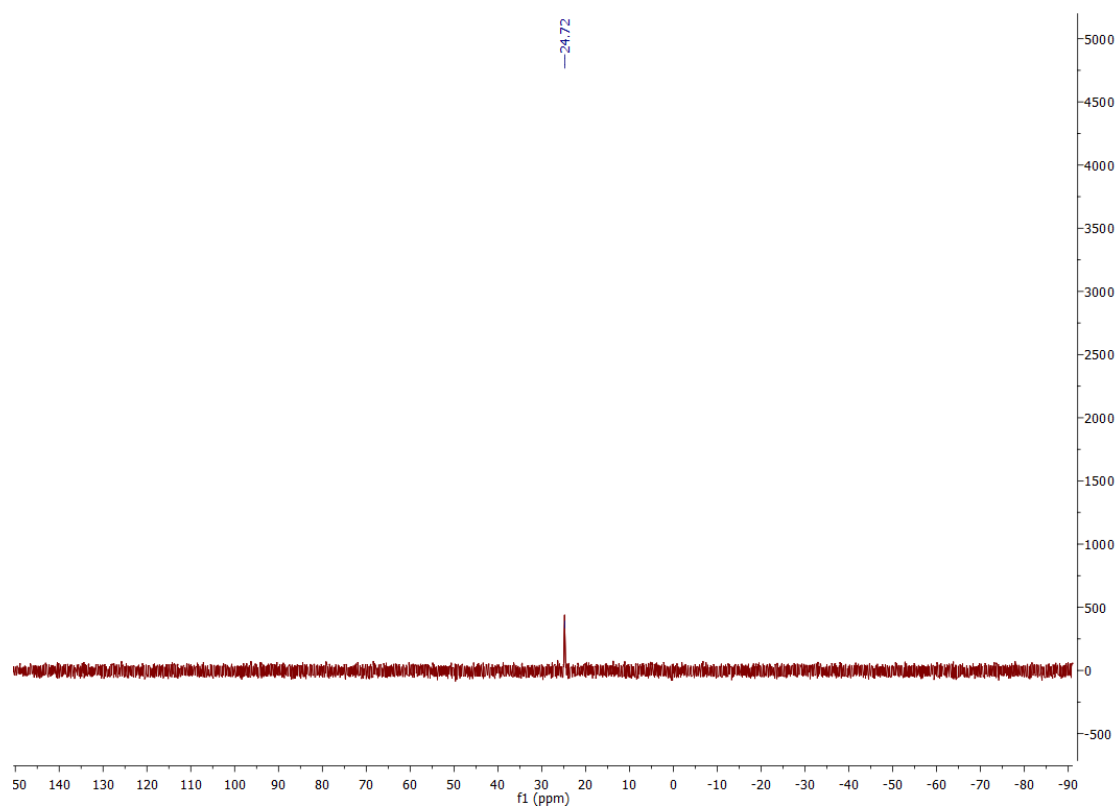
Anexo A 1.51.3. Espectro de ^{13}C -RMN



Anexo A 1.50.4. Espectro de HSQC



Anexo A 1.51.5. Espectro de ^{31}P -RMN



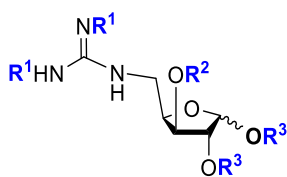
Anexo B

B1 – Numeração dos compostos em estudo

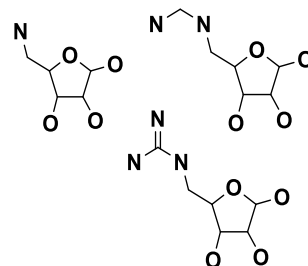
Anexo B 1.1. Numeração dos compostos correspondentes ao SET1

SET1

R^1 =Boc, H;
 R^2 =H, Bn, PMB, C_3H_3 , C_3H_5 ,
 C_3H_7 , C_8H_{17} , $C_{10}H_{21}$, $C_{12}H_{25}$,
 Triazole Protegido, Triazole;
 R^3 = i-Prop, H (α , β)

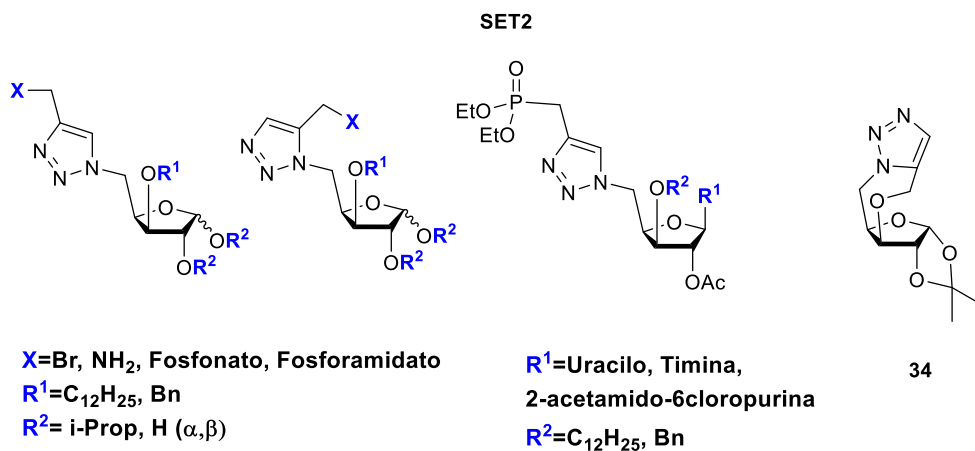


Biblioteca 1 PubChem



| R^2 | R^1 =Boc | R^1 =H |
|--------------------|---|---|
| H | A1:i-prop; A2: α ; A3: β | A4:i-prop; A5: α ; A6: β |
| Bn | A7:i-prop (26); A8: α ; A9: β | A10:i-prop; A11: α ; A12: β |
| PMB | A13:i-prop; A14: α ; A15: β | A16:i-prop; A17: α ; A18: β |
| C_3H_3 | A19:i-prop (30); A20: α ; A21: β | A22:i-prop; A23: α ; A24: β |
| C_3H_5 | A25:i-prop (29); A26: α ; A27: β | A28:i-prop; A29: α ; A30: β |
| C_3H_7 | A31:i-prop (28); A32: α ; A33: β | A34:i-prop; A35: α ; A36: β |
| C_8H_{17} | A37:i-prop; A38: α ; A39: β | A40:i-prop; A41: α ; A42: β |
| $C_{10}H_{21}$ | A43:i-prop; A44: α ; A45: β | A46:i-prop; A47: α ; A48: β |
| $C_{12}H_{25}$ | A49:i-prop (27); A50: α ; A51: β | A52:i-prop; A53: α ; A54: β |
| Triazole protegido | A55:i-prop; A56: α ; A57: β | A58:i-prop; A59: α ; A60: β |
| Triazole | A61:i-prop; A62: α ; A63: β | A64:i-prop; A65: α ; A66: β |

Anexo B 1.2. Numeração dos compostos correspondentes ao SET2

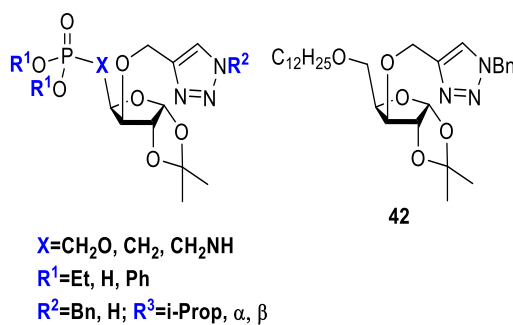


| X | Regioisómero 1,4 | | Regioisómero 1,5 | |
|-----------------|---|---|---|---|
| | R=C ₁₂ H ₂₅ | R=Bn | R= C ₁₂ H ₂₅ | R=Bn |
| Br | B1:i-prop (47); B2:α; B3:β | B4:i-prop (45); B5:α; B6:β | B7:i-prop (48); B8:α; B9:β | B10:i-prop (46); B11:α; B12:β |
| NH ₂ | B13:i-prop (54); B14:α; B15:β | B16:i-prop (52); B17:α; B18:β | B19:i-prop (55); B20:α; B21:β | B22:i-prop (53); B23:α; B24:β |
| Fosfonato | B25:i-prop (50); B26:α; B27:β | B28:i-prop (49); B29:α; B30:β | B31:i-prop (51); B32:α; B33:β | B34:i-prop; B35:α; B36:β |
| Fosforamidato | B37:i-prop (57); B38:α; B39:β | B40:i-prop (56); B41:α; B42:β | B43:i-prop (58); B44:α; B45:β | B46:i-prop; B47:α; B48:β |

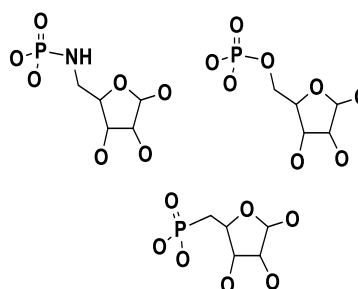
| R ¹ | Regioisómero 1,4 | | Regioisómero 1,5 | |
|--------------------------------|---|--------------------|--|--------------------|
| | R ² =C ₁₂ H ₂₅ | R ² =Bn | R ² = C ₁₂ H ₂₅ | R ² =Bn |
| Uracilo | B49 (62) | B50 (61) | B51 | B52 |
| Timina | B53 | B54 | B55 | B56 |
| 2-Acetoamido- 6-Cloropurina | B57 | B58 | B59 | B60 |

Anexo B 1.3. Numeração dos compostos correspondentes ao SET3

SET3



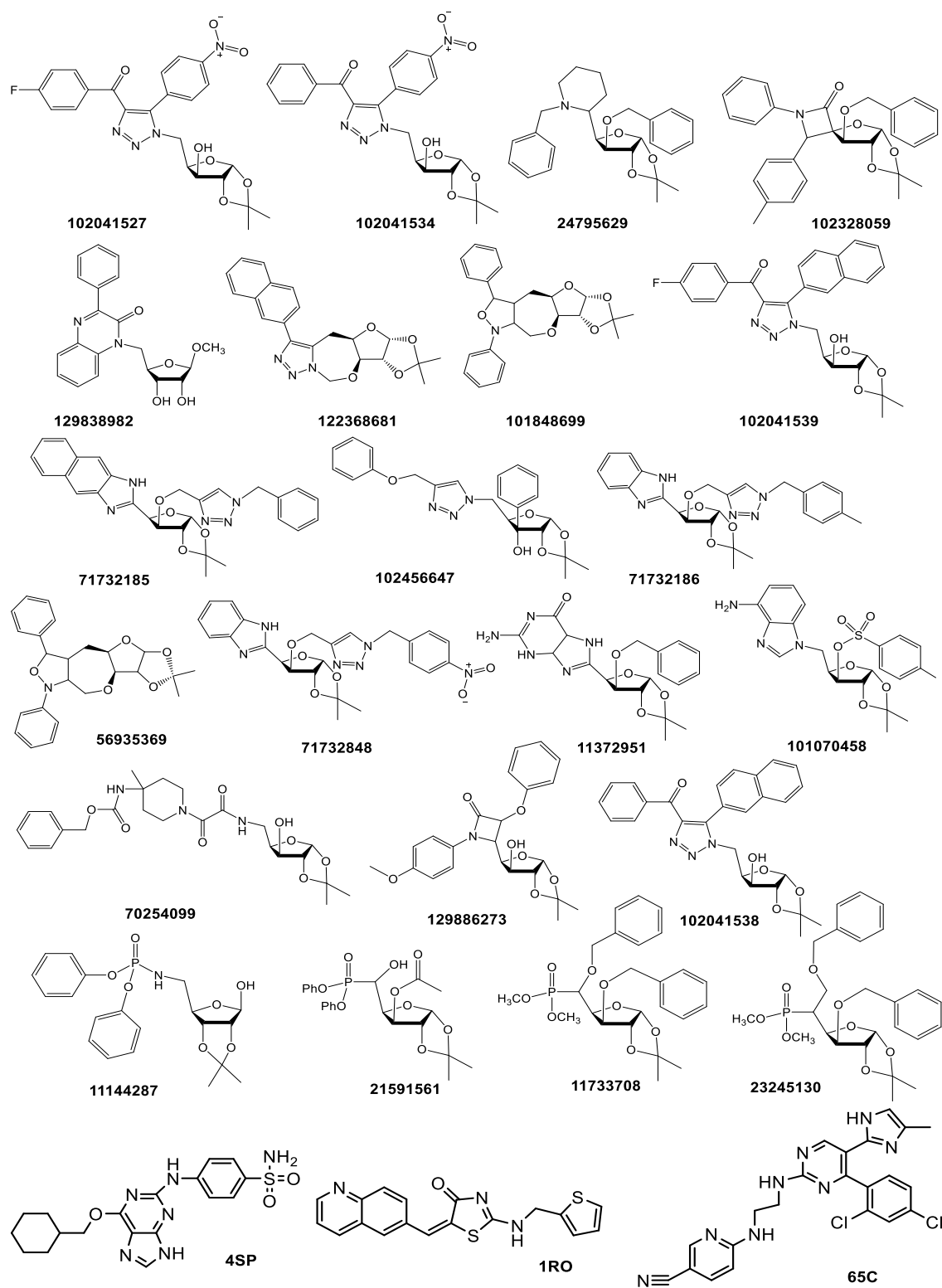
Biblioteca 2 PubChem



| | R ¹ =Et | | R ¹ =Ph | | R ¹ =H | |
|---------------------------|---|-----------------------------|--|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | R ² =Bn | R ² =H | R ² =Bn | R ² =H | R ² =Bn | R ² =H |
| X=CH₂O | C1:i-prop (37); C2:α; C3:β | C4:i-prop; C5:α; C6:β | C7:i-prop (34); C8:α; C9:β | C10:i-prop; C11:α; C12:β | C13:i-prop; C14:α; C15:β | C16:i-prop; C17:α; C18:β |
| | R ¹ =Et | | R ¹ =Me | | R ¹ =H | |
| | R ² =Bn | R ² =H | R ² =Bn | R ² =H | R ² =Bn | R ² =H |
| X=CH₂ | C19:i-prop; C20:α; C21:β | C22:i-prop; C23:α; C24:β | C25:i-prop; C26:α; C27:β | C28:i-prop; C29:α; C30:β | C31:i-prop; C32:α; C33:β | C34:i-prop; C35:α; C36:β |
| X=CH₂NH | C37:i-prop (40); C38:α; C39:β | C40:i-prop; C41:α; C42:β | C43:i-prop; C44:α; C45:β | C46:i-prop; C47:α; C48:β | C49:i-prop; C50:α; C51:β | C51:i-prop; C52:α; C53:β |

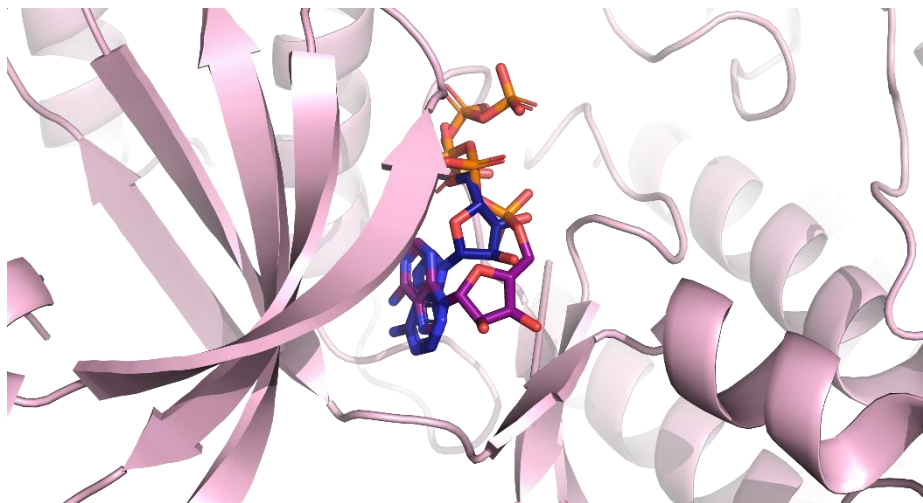
B2 – Estrutura dos compostos da PubChem com os respectivos CID e dos inibidores das enzimas estudadas.

Anexo B 2.1. Estrutura dos compostos da PubChem apresentados nas tabelas 2 e 3 e dos inibidores de cada enzima (4SP, 1RO e 65C)

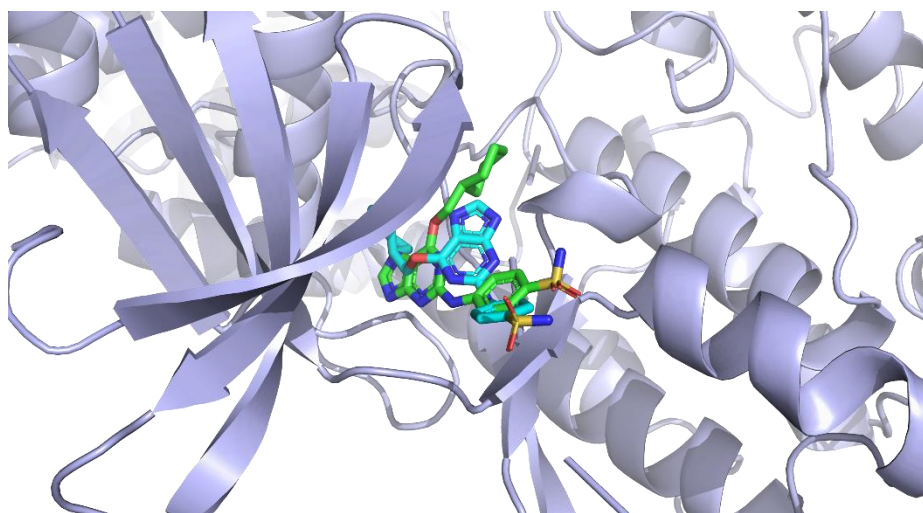


B3 – Imagens geradas pelo PyMOL

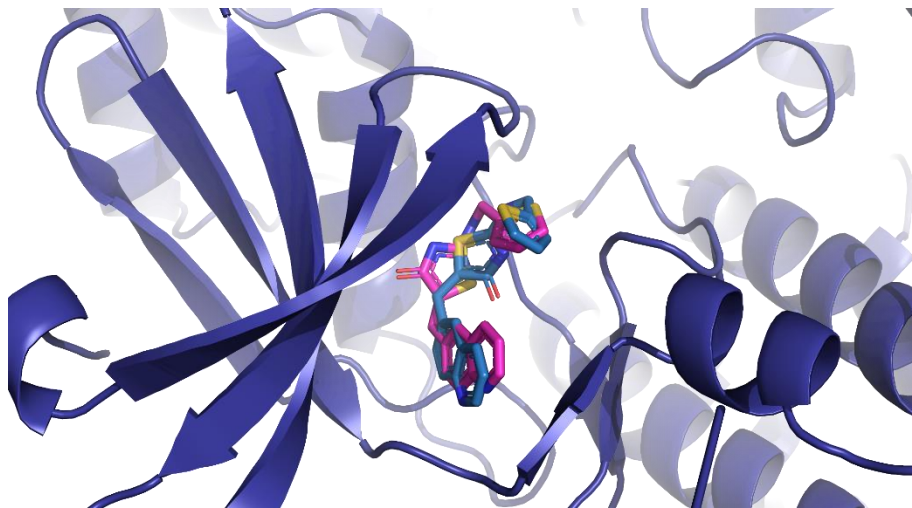
Anexo B 3.1. Sobreposição da CDK2 cristalizada com o ATP (a azul, PDB: 4EOQ) *versus* a pose do ATP com melhor resultado obtida pelos estudos do *docking* molecular (roxo).



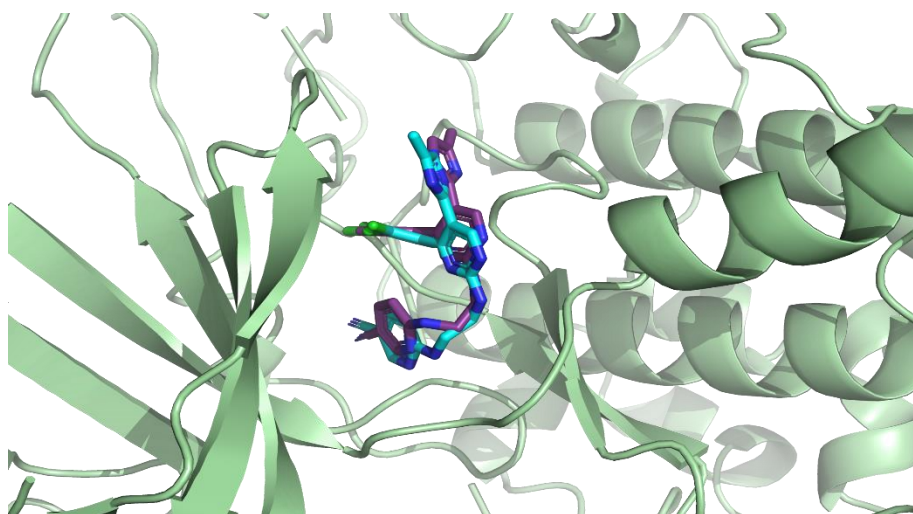
Anexo B 3.2. Sobreposição da CDK2 cristalizada com o inibidor 4SP (a verde, PDB: 4EOR) *versus* a pose do inibidor 4SP com melhor resultado obtida pelos estudos do *docking* molecular (roxo).



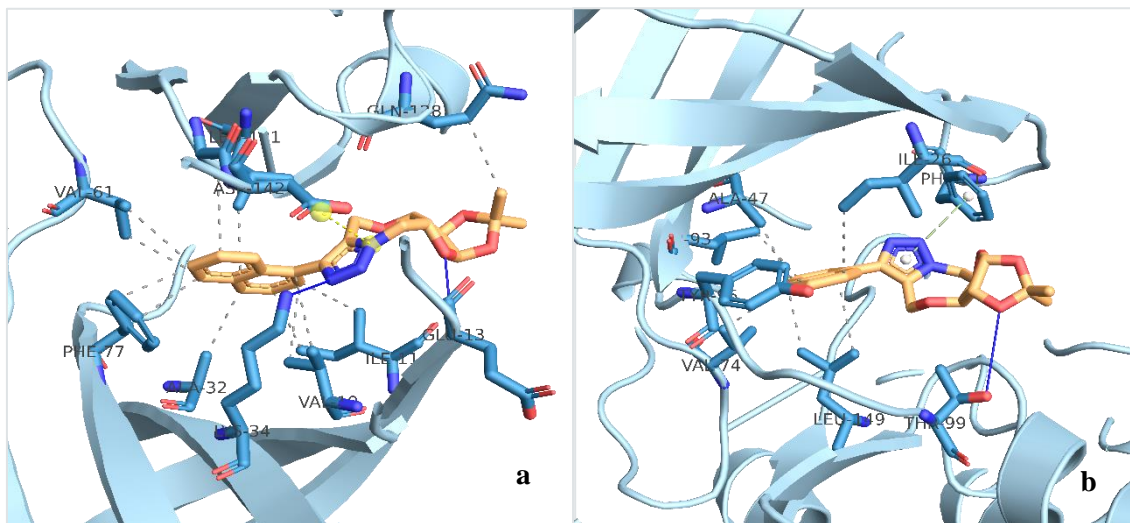
Anexo B 3.3. Sobreposição da CDK2 cristalizada com o inibidor 1RO (a azul claro, PDB: 4EOS) *versus* a pose do inibidor 4SP com melhor resultado obtida pelos estudos do *docking* molecular (rosa).



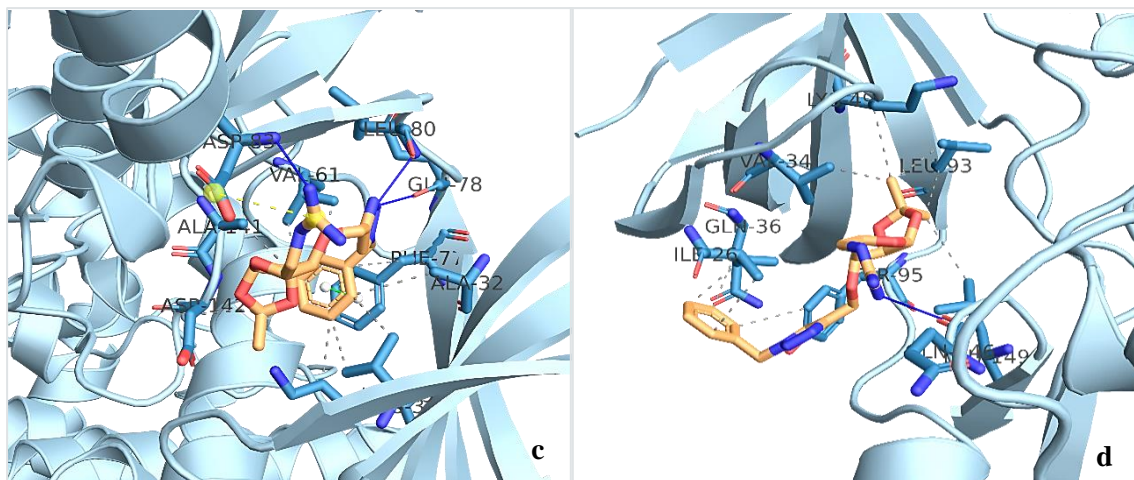
Anexo B 3.4. Sobreposição da GSK3 β cristalizada com o inibidor 65C (a azul, PDB: 6B8J) *versus* a pose do inibidor 4SP com melhor resultado obtida pelos estudos do *docking* molecular (roxo).



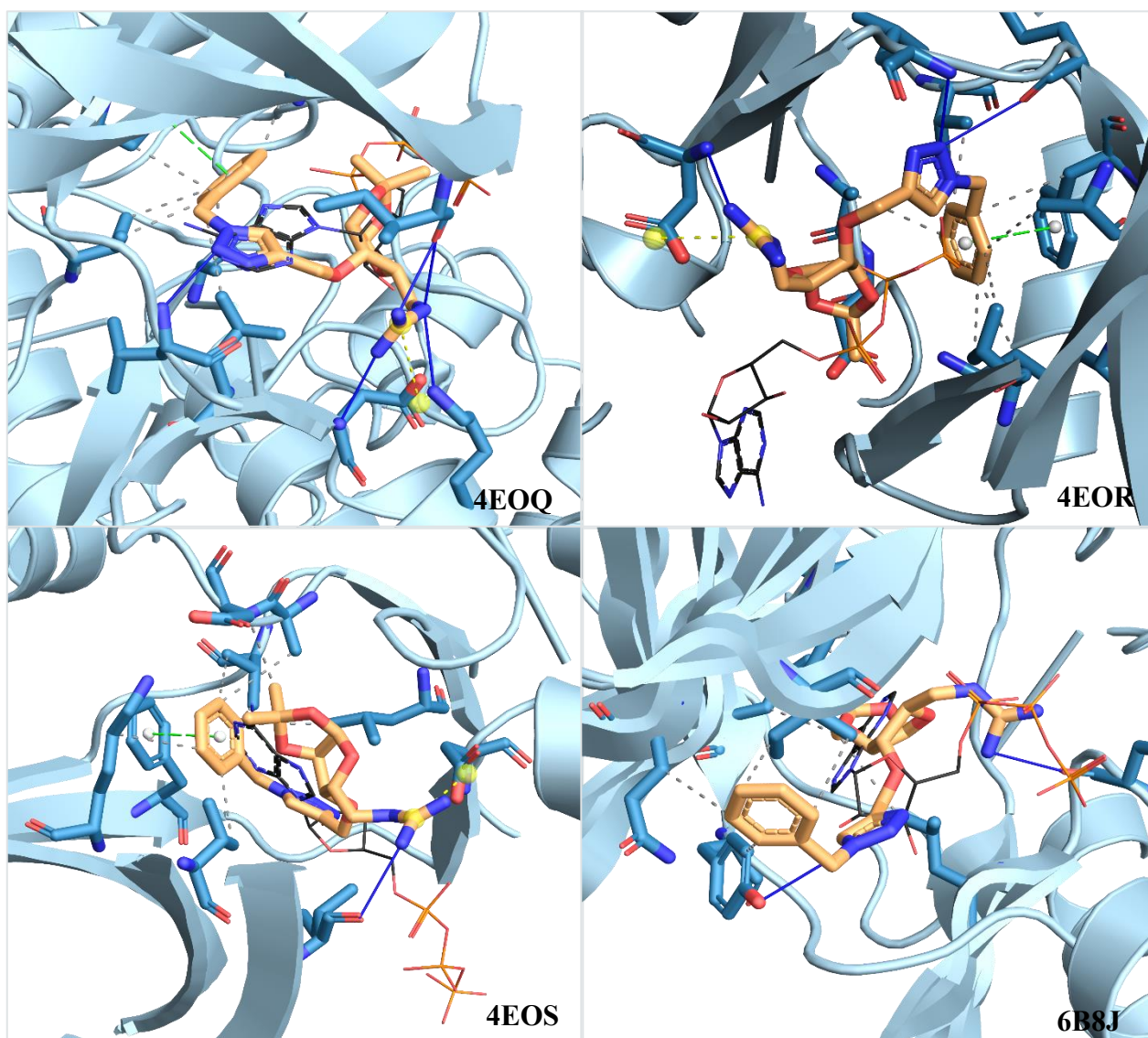
Anexo B 3.5. Interação do composto 122368681 com: **a)** a CDK2 (PDB: 4EOR); **b)** a GSK3 β (PDB: 6B8J).



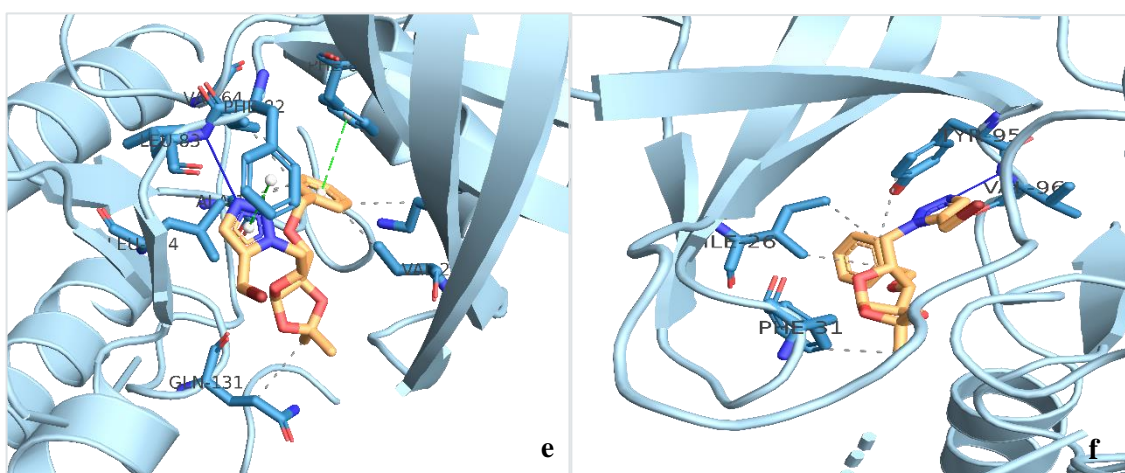
Anexo B 3.6. Interação do composto A58 com: **c)** a CDK2 (PDB: 4EOQ); **d)** a GSK3 β (PDB: 6B8J).



Anexo B 3.7. Interação do composto A58 com as CDK2 (PDB: 4EOQ; 4EOR; 4EOS) e com a GSK3 β (PDB: 6B8J). Comparação com o ATP (a preto).



Anexo B 3.8. Interação do composto B10 com: e) a CDK2 (PDB: 4EOS); f) a GSK3 β (PDB: 6B8J)



Anexo B 3.9. Interação do composto C7 com: **g)** a CDK2 (PDB:4EOR); **h)** a GSK3 β (PDB: 6B8J)

